

Université de Montréal

Le potentiel thérapeutique du GDF-5 dans l'arthrose :
Une étude *in vitro* des facteurs anaboliques et
cataboliques du cartilage

par

Jean-Marc Brunet Maheu

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de maître
en Sciences biomédicales
option générale

Septembre 2010

© Jean-Marc Brunet Maheu, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Le potentiel thérapeutique du GDF-5 dans l'arthrose : une étude *in vitro* des facteurs
anaboliques et cataboliques du cartilage

Présenté par :
Jean-Marc Brunet Maheu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Moreau, président-rapporteur
Patrick Lavigne, directeur de recherche
Nicola Hagemeister, co-directeur
Florina Moldovan, membre du jury

Résumé

Introduction : Le principal objectif de cette étude est de mesurer l'effet du GDF-5 sur l'homéostasie du cartilage. Le GDF-5 est un gène de susceptibilité de l'OA faisant partie de la famille des BMPs et qui favorise la synthèse du cartilage. Le but de notre étude a été de déterminer l'effet du GDF-5 sur le métabolisme catabolique ainsi que sur l'équilibre global des chondrocytes, principalement au niveau de l'Aggrécan.

Méthode : Des chondrocytes arthrosiques canins et humains OA ont été exposés au GDF-5. L'expression des ARNm et des protéines a été analysée afin d'évaluer la production de l'Aggrécan et le ratio Col-II/Col-I au niveau des facteurs anaboliques et du phénotype. Pour le catabolisme, l'expression et l'activité des aggrécanases ADAMTS-4 et ADAMTS-5 ont été mesurées. Les épitopes NITEGE et CTX-II ont aussi été quantifiés dans le liquide synovial canin après des injections intraarticulaires de GDF-5.

Résultats : Le GDF-5 provoque une augmentation de l'activité cellulaire des chondrocytes canins et humains. Pour les ARNm et l'expression protéique, le GDF-5 augmente l'expression de l'Aggrécan alors que les facteurs cataboliques le diminuent. Le phénotype reste inchangé en présence du produit, sauf à haute dose où on augmente le Col-I. L'activité des aggrécanases diminue puisque l'épitope NITEGE diminue alors que le CTX-II augmente dans l'articulation.

Conclusion : En somme, les facteurs anaboliques du cartilage sont favorisés, alors que les facteurs cataboliques sont diminués par le GDF-5. Cette action double permet d'illustrer l'effet du GDF-5, le classant comme un potentiel médicament modifiant la maladie de l'OA qui mérite d'être étudiée.

Mots-clés : Arthrose (OA), Chondrocytes, Aggrecan, Aggrecanases, GDF-5, ADAMTS-4, ADAMTS-5, Pond-Nuki, NITEGE, CTX-II

Abstract

Purpose: The objective of this study is to assess the effect of GDF-5 on cartilage homeostasis. GDF-5 is a susceptibility gene for OA and member of the BMP super family. Studies have shown that it can increase expression of anabolic factors in chondrocytes. Therefore, our study indentifies how GDF-5 influences this metabolism and the global homeostasis of chondrocytes, aiming mainly towards Aggrecan.

Methods : Osteoarthritic (OA) chondrocytes from canine and human models were exposed to GDF-5. Protein expressions, along with mRNA expression were assessed in order to investigate Aggrecan production and the ratio of Col-II/Col-I, for the anabolic phenotype markers. The aggrecanases ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and their global activity were assed for the catabolic factors. The NITEGE and CTX-II epitope were also measured in synovial fluid of Pond-Nuki dogs that received intraarticular GDF-5 injections.

Results : GDF-5 increases chondrocyte cellular activity, in our canine and human models. Both mRNA and protein expression of the chondrocytes Aggrecan were increased and the aggrecanases expression and activity were decreased. Collagen ratio did not show a phenotype, except et high dosage where the Col-I production is induced. Aggrecanase activity was lowered while CTX-II was increased.

Conclusion : In conclusion, the anabolic cellular activity of OA chondrocytes increases while the catabolic factors decrease in presence of GDF-5. This double action illustrates the global effect of GDF-5, identifying it as a potential disease modifying factor of OA that should be further investigated.

Keywords : Osteoarthritis (OA), Chondrocytes, Aggrecan, Aggrecanase, GDF-5, ADAMTS-4, ADAMTS-5, Pond-Nuki, NITEGE, CTX-II

Table des matières

INTRODUCTION	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	2
<i>Le cartilage articulaire.....</i>	<i>2</i>
Fonction :	2
Développement :	2
<i>Structure et sa composition.....</i>	<i>3</i>
Collagène :	6
Aggrécane :	7
<i>Métabolisme du cartilage :</i>	<i>9</i>
L'ARTHROSE.....	12
<i>Les causes de l'OA :</i>	<i>12</i>
Le vieillissement :	12
Prédispositions et atteintes génétiques :	13
La localisation des articulations:	16
L'obésité :	16
Les traumatismes :	17
<i>Les changements provoqués par l'OA :</i>	<i>18</i>
Changements macroscopiques :	18
Formation des ostéophytes :	19
Changements moléculaires :	20
Changements cellulaires :	22
<i>Le traitement de l'OA :</i>	<i>26</i>
Les traitements non pharmacologiques :	26
Les traitements pharmacologiques locaux:	27
Les traitements pharmacologiques systémiques :	28
Les traitements pharmacologiques par corticostéroïdes :	29
Les traitements qui modifient la maladie :	29
LE GDF-5	31
<i>Le modèle Pond-Nuki :</i>	<i>34</i>
OBJECTIFS.....	35
HYPOTHÈSES.....	36

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	37
LE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS À PARTIR DU PLATEAU TIBIAL.....	37
ÉTUDE <i>IN VIVO</i> PRÉLIMINAIRE	38
CULTURE CELLULAIRE.....	39
LA STIMULATION CELLULAIRE	40
ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE	41
ANALYSES QPCR.....	44
ANALYSE STATISTIQUE.....	47
CHAPITRE 3. RÉSULTATS.....	48
VALIDATION DU MODÈLE CANIN	48
ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE.....	50
<i>Analyse PCR des chondrocytes canins:</i>	50
<i>Analyse PCR des chondrocytes OA humains</i>	57
ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE	63
<i>Analyse d'expression protéique des chondrocytes canins:</i>	63
<i>Analyse d'expression protéique des chondrocytes OA humains :</i>	69
ANALYSE DE L'ACTIVITÉ DES AGGRÉCANASES	75
RÉSULTATS <i>IN VIVO</i> PRÉLIMINAIRES.....	79
CHAPITRE 4. DISCUSSION	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES	95
BIBLIOGRAPHIE.....	I

Liste des tableaux

Tableau 1: gènes d'intérêts qui sont susceptibles de provoquer l'OA du genou suite à des mutations.....15

*Tableau 2: séquences des amorces utilisées afin d'amplifier les différents gènes lors de l'étape du PCR
quantitatif.....46*

Liste des figures

<i>Figure 1: coupe du cartilage articulaire</i>	5
<i>Figure 2: structure de l'aggrécan</i>	8
<i>Figure 3: principales interactions moléculaires entre les différentes cellules impliquées dans la destruction du cartilage dans un contexte d'OA.</i>	21
<i>Figure 4: structure des ADAMTS-4 et ADAMTS-5</i>	24
<i>Figure 5: signalisation des molécules BMP/TGF-β à travers la voie de signalisation des Smad</i>	33
<i>Figure 6: genou canin suite à 8 semaines d'effort physique normal après une lacération du LCA.</i>	49
<i>Figure 7: Expression des ARNm de l'Aggrécan</i>	51
<i>Figure 8: Expression du ratio d'ARNm des Col-II /Col-I de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5</i>	52
<i>Figure 9: Expression des ARNm de l'ADAMTS-4 de chondrocytes OA canins</i>	54
<i>Figure 10: Expression des ARNm de l'ADAMTS-5 de chondrocytes OA canins</i>	55
<i>Figure 11: Expression des ARNm de l'Aggrécan de chondrocytes OA humains</i>	58
<i>Figure 12: Expression du ratio Col-I/Col-II de chondrocytes OA humains</i>	59
<i>Figure 13: Expression des ARNm de l'ADAMTS-4 de chondrocytes OA humains</i>	60
<i>Figure 14: Expression des ARNm de l'ADAMTS-5 de chondrocytes OA humains</i>	61
<i>Figure 15: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine Aggrécan de chondrocytes OA canins</i>	64
<i>Figure 16: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-4 de chondrocytes OA canins</i>	66
<i>Figure 17: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-5 de chondrocytes OA canins</i>	68
<i>Figure 18: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine Aggrécan de chondrocytes OA humains</i>	70
<i>Figure 19: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-4 de chondrocytes OA humains</i>	72
<i>Figure 20: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-5 de chondrocytes OA humains</i>	74
<i>Figure 21: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de l'épitope N-Terminale de l'Aggrécan de chondrocytes OA canins</i>	76
<i>Figure 22: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de l'épitope N-Terminale de l'Aggrécan de chondrocytes OA humains</i>	77
<i>Figure 23: Concentration de fragment CTX-II dans le liquide synovial de chiens</i>	80

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique
AINS : Médicament anti-inflammatoire non stéroïdien
ARN: Acide Ribonucléique
ADAMTS : « A Disintegrin-Like and Metalloproteinase with Thrombospondin»
BMP : «Bone Morphogenic Protein»
Col-I: Collagène de type I
Col-II: Collagène de type II
Cox : Cyclooxygénase
CS: Chondroïtine Sulfate
CTX-II : C-Terminal collagen-II fragment
DMEM : «Dulbecco's Modified Eagle Medium»
FBS: «Fetal Bovine Serum»
GAG: Glycosaminoglycan
GAPDH: Glyceraldéhyde-3-Phosphate Dehydrogénase
IGF : «insulin-like growth factor »
IL-1: Interleukine-1
IL-1Ra : Récepteur antagoniste à l'Interleukine-1
KS: Keratan Sulfate
LCA : Ligament croisé-antérieur
MIN : minutes
MMP: «Matrix metalloproteinase»
NITEGE : Aggrecan N-Terminal Neoepitope
OA : Arthrose
PBS:« Phosphate Buffered Solution»
PCR: «Polymerase Chain Reaction»
PS: «Penicillin-Streptomycin»
RT: Transcription inverse
TGF- β : «Transforming Growth Factor»
TIMP: « Tissue Inhibitor of Metalloproteinase»
TNF: «Tumor necrosis factor»
TTBS : «Tris-Tween Buffered Solution»
VEGF: Vascular endothelial growth factor»

À mes parents

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont permis de réaliser cette œuvre. J'aimerais ainsi, remercier Dr. Patrick Lavigne qui fut mon directeur de recherche et qui m'a donné les outils de recherche nécessaires à la réalisation de ces recherches. Mais encore, Dr. Mohamed Benderdour et Dr. Qin Shi qui ont développé mes connaissances de laboratoire et mon éthique de recherche et qui m'ont été d'un grand support pendant tout mon parcours. J'aimerais aussi remercier le support financier que j'ai obtenu, notamment la bourse d'étude J.A.DeSève du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur. Or, ces techniques et ces découvertes ne valent rien sans leur communication, notamment par ce mémoire. J'aimerais, enfin, remercier, plus que tout autres, Sarah-Eve Blais qui m'a aidé dans les moments les plus difficiles de cette œuvre, pour sa création, sa correction et son dépôt.

Introduction

L'arthrose (OA) est une maladie irréversible menant non seulement à la dégénérescence du cartilage articulaire, mais aussi à des modifications de l'os et des autres structures articulaires. Bien que plusieurs modalités thérapeutiques existent, le traitement initial se limite au soin des symptômes et repose principalement sur des modalités pharmacologiques. En phase avancée, lorsque la qualité de vie des patients est fortement diminuée, la chirurgie de remplacement articulaire demeure l'option de choix, malgré la morbidité associée à cette chirurgie. Depuis plusieurs années, nombreuses études ont tenté de trouver un médicament qui pourrait ralentir voir arrêter la progression de l'arthrose. Récemment, des études génétiques à grande échelle ont permis d'associer certains gènes de susceptibilité de l'OA (1). Il est intéressant de noter que plusieurs gènes impliqués dans le développement des articulations ont été associés à l'OA. Du nombre, le gène du «growth and differentiation factor», le GDF-5, est identifié dans plusieurs populations comme étant associé à l'OA (1-3). Bien que son rôle dans le développement embryonnaire des articulations soit décrit (2;3) et que son importance potentielle dans la vie adulte demeure mal connue, des études in vitro démontrent un effet positif sur la synthèse des «glycoaminoglycans» GAG (4;5). Ainsi, puisqu'une association semble exister entre l'OA et le GDF-5, et que ce dernier possède des propriétés favorables sur les composantes de la matrice cartilagineuse, il devient donc intéressant d'étudier le potentiel chondroprotecteur du GDF-5 dans un contexte d'OA.

État des connaissances

Le cartilage articulaire

Fonction :

Le principal objet de l'étude est le cartilage articulaire. Il s'agit de la structure qui recouvre les os de diverses articulations afin de permettre un mouvement sans résistance de friction. Au niveau du genou, le cartilage hyalin, un tissu avasculaire, assume les fonctions d'amortir les chocs et le poids, tout en lubrifiant l'ensemble des mouvements articulaires. Il est aussi susceptible à plusieurs maladies, notamment l'arthrose et l'arthrite, qui affectent un large spectre de la population.

Développement :

Le cartilage hyalin se développe dès l'embryogénèse. À ce stade, le squelette est majoritairement cartilagineux, mais contient certaines structures osseuses. En dégradant la structure cartilagineuse autour d'elles, ces zones osseuses primaires se développent pour créer l'os. Par contre, ce processus ne permet pas de remplacer tout le cartilage. En effet, le cartilage aux extrémités de la structure résiste et la présence d'une plaque métaphysaire permet une production constante, lors de la croissance, de cartilage. Située à l'intérieur de l'os mais près des extrémités, cette production de cartilage subit l'attaque du développement osseux. Quant à elle, la structure résistante aux extrémités ne produit pas

d'excédant de cartilage et n'est donc pas majoritairement responsable de la croissance. Elle survit donc en ayant les nutriments nécessaires, par la cavité synoviale, pour ne pas se détériorer et devenir à son tour, de l'os.

Le contrôle de ce développement, tant de l'os que du cartilage est géré principalement par les molécules de la famille des «bone morphogenic proteins» (BMPs). La détérioration du cartilage est provoquée par une calcification qui, combinée à une angiogenèse, favorise l'apparition du tissu osseux. À mesure que la matrice devient plus solide, les chondrocytes meurent et laissent place à des vaisseaux sanguins chargés d'ostéoblastes. Cette angiogenèse est majoritairement gérée par le Vascular endothelial growth factor (VEGF) et ses récepteurs. Ils remplacent alors les chondrocytes et forment une matrice osseuse, permettant la croissance du tissu osseux (6).

Structure et sa composition

Le cartilage articulaire est essentiellement composé de cellules appelées chondrocytes et de leur matrice extracellulaire. Cette couche superficielle au tissu osseux permet, dans les articulations, un partage des forces/charges qui s'appliquent sur l'articulation et permet aussi un mouvement libre entre les os. Il s'agit d'une couche extrêmement bien organisée où quatre divisions en couches permettent un fonctionnement optimal : superficielle, médiane, radiale et les zones calcifiées.

La première couche se retrouve à la surface de l'articulation. Cette couche superficielle se compose principalement de fibres de collagène perpendiculaires à la surface, sous lesquelles se retrouve une couche concentrée de cellules chondrocytes allongées et orientées de façon parallèle à la surface. Ce réseau de collagènes permet alors l'élasticité du tissu de même qu'une résistance aux forces qui s'appliquent lors du mouvement (7). Suite à une couche de transition, la section médiane, quant à elle, est la plus importante pour ce qui est de sa taille. Elle est composée de réseaux de collagènes et de protéoglycanes entre lesquels se retrouvent des chondrocytes ronds. Pour la couche plus profonde, c'est-à-dire celle plus près de l'os, les chondrocytes sont encore ronds et peu confluent, mais perpendiculaires à la surface. La matrice de cette zone possède à la fois une grande concentration d'Aggrécans et une couche de fibres de collagène plus épaisse. Finalement, les zones calcifiées représentent la jonction entre le tissu osseux et le cartilage. On y retrouve des filaments de collagène qui s'unissent en forme d'attache entre les deux tissus de même qu'une population cellulaire faible, mais hypertrophiée (7).

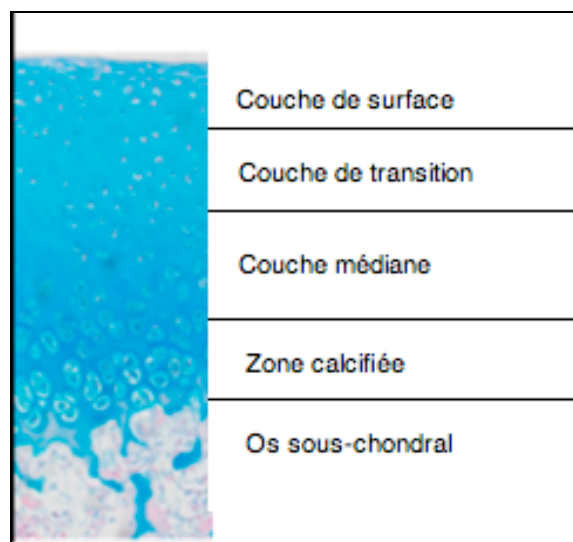


Figure 1: Figure représentant une coupe du cartilage articulaire. La section de droite présente les différentes couches du cartilage tandis que la partie du bas représente l'os sous-chondral, puis, en remontant, la zone calcifiée, la couche médiane, la couche de transition avec la couche de surface et la couche de surface. La figure a été tirée et adaptée de Clouet et Al, 2009 (8).

En termes de composantes non cellulaires, le cartilage se compose de différentes protéines telles le collagène et les protéoglycanes dont l'Aggrécane, qui lui permettent de rester intact lorsqu'il assume sa fonction. Mis à part ces molécules, notons que près de 80% du poids restant est constitué d'eau et de divers minéraux dont la fonction est de nourrir et de lubrifier l'ensemble du système. De plus, le collagène représente un peu plus de la moitié des protéines de la matrice extracellulaire, composée majoritairement de collagène de type II (Col-II), spécifique à ce tissu. Les protéoglycanes assument, quant à eux, environ 10% du poids restant (9).

Collagène :

À ce qui a trait au réseau de collagènes qui compose principalement le cartilage articulaire, il faut essentiellement s'attarder au Col-II. Cette protéine se compose de trois chaînes polypeptidiques qui s'enroulent entre elles pour former hélice trimérique. Ces fibres peuvent alors s'agglomérer latéralement entre elles et avec différentes protéines d'union ou de «linkage» pour former un réseau de filaments, ce qui donne le réseau de fibres de collagènes décrit plus haut (10). En ce qui concerne sa production, les différents polypeptides sont d'abord synthétisés en pro-chaînes avec de longs polypeptides à chacune des extrémités qui dépassent de la triple hélice lors de l'agglomération intracellulaire, agglomération pour laquelle ils sont essentiels. Les extrémités de la protéine sont dégradées lorsqu'elle sort de la cellule. Cela produit deux fragments : le collagène de type IIA, qui se retrouve dans le cartilage nouvellement formé, et le collagène IIB, qui est présent dans toute la couche de cartilage (10;11).

Par contre, une fois établi en réseau de fibres/filaments de collagène, il est difficile d'effectuer une dégradation de ces molécules. Cependant, des protéines spécifiques, notamment les métalloprotéines (MMP) associées au collagène ou collagénases, ont comme objectifs de cliver ces macroprotéines. Pour ce faire, elles agissent généralement en coupant un des polypeptides des triples hélices, ce qui le libère dans le milieu environnant. Cela crée une zone instable dans les fibres et diminue leur résistance physique et leur résistance face à la dégradation protéolytique des MMPs. Comme principales collagénases, notons les

MMP-1, MMP-8 et MMP-13 où cette dernière favorise le clivage du collagène de type II (12).

Aggrécan :

L'Aggrécan est une des protéines les plus importantes dans la matrice extracellulaire des chondrocytes. De par sa structure, son rôle dans cette matrice est de fournir le support et une grande résistance aux forces qui peuvent s'appliquer sur le cartilage (13). Cela est dû à la charge positive de la molécule qui lui permet d'emprisonner l'eau entre ses liens par osmose et à sa capacité de lier de façon non-covalente les molécules de collagènes présentes dans la matrice (14). En se basant sur la *Figure 2*, la structure de l'Aggrécan se compose de deux domaines globulaires (G1 et G2) à son extrémité N-terminale qui sont séparés entre eux par un groupe IGD, associée à l'épitope NITEGE pour l'identification de la protéine. À partir de ces domaines et en allant vers l'extrémité C-terminale, on note d'abord une chaîne de «Keratan Sulfate» (KS) suivie d'une longue chaîne de «Chondroïtine Sulfate» (CS), ou glycoaminoglycans (GAG), CS-1 et CS-2, suivie par un domaine globulaire (G3). Au pôle G1, une protéine de liaison ou «Link protein» (LP) permet l'attachement à une protéine d'Hyaluronan (HA), essentielle à la formation d'aggrégats.

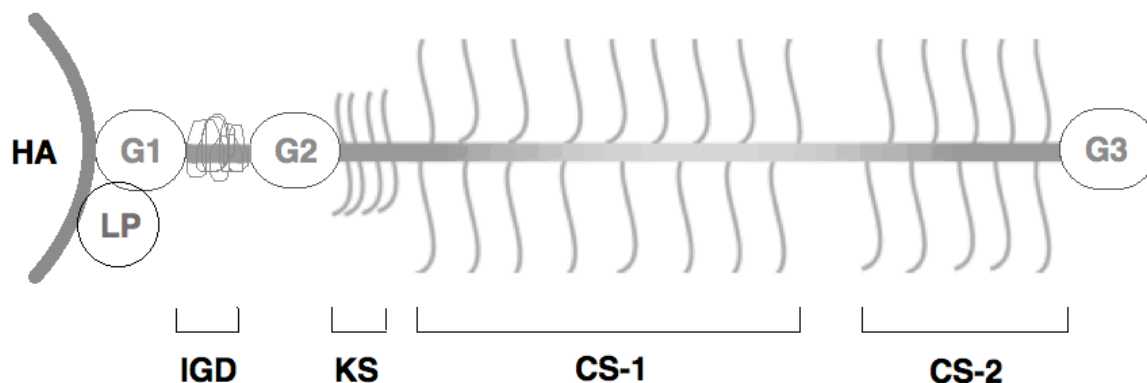


Figure 2: Cette figure présente la structure de l'aggrécan de la matrice extracellulaire des chondrocytes. Les trois globes G1, G2 et G3 représentent des zones globulaires sur le squelette. Les sections CS montrent que le cœur de la protéine est composé de «Chondroïtine sulfate» alors que la zone KS représente le «Kératane Sulfate». IGD représente l'espace interglobulaire et LP la protéine de liaison. Figure tirée et adaptée de Huang K et al., 2008 (15).

Dans la matrice extracellulaire, ces protéines forment des aggrégats en se liant aux fragments d'Hyaluronan. Ces aggrégats peuvent se composer de près d'une centaine de protéines (13;16;17) et diffèrent à la fois par la concentration de «Link Protein», par la longueur des protéines d'Hyaluronan et par le métabolisme de l'Aggrécan (18). À l'état physiologique normal, l'Aggrécan est maintenue à l'état d'équilibre par une constante synthèse/dégradation. Or, lors de sa dégradation, la protéine est clivée, laissant le domaine G1 attaché à l'Hyaluronan et le reste dans le liquide synovial. Lors de dégradations importantes, l'accumulation continue concentre le complexe G1/Hyaluronan dans la matrice et diminue les complexes GAG (CS-1 et CS-2), qui sont responsables de la capacité de résistance du complexe protéique (19;20).

Métabolisme du cartilage :

La structure moléculaire et organisationnelle peut être représentée par un équilibre. D'une part, il y a les facteurs anaboliques qui vont favoriser la production des protéines de structures, comme les collagènes et l'Aggrécan, ainsi que la survie des chondrocytes. D'autre part, il y a les facteurs cataboliques qui vont dégrader ces mêmes protéines de structures et qui favorisent la destruction du cartilage.

Pour ce qui est des facteurs anaboliques, il y a d'abord la présence de facteurs de croissance. Les principaux font parties des familles du «transforming growth factor- β » (TGF- β) et des insuline-like growth factors» (IGFs). La première famille est multifonctionnelle et favorise la croissance cellulaire et la formation de la matrice extracellulaire. Sa présence au niveau du cartilage favorise à la fois une activité pro et anti-inflammatoire. Ainsi, elle bloque l'activité de l'«interleukine 1- β » (IL-1 β), qui est responsable d'un large spectre d'effets inflammatoires, et induit l'inflammation dans la synoviale du genou (21-23). Or, parmi cette grande famille, notons les protéines BMP. Elles sont d'excellents stimulants de la formation osseuse et cartilagineuse ainsi que de la matrice extracellulaire des chondrocytes. Des études ont, notamment, démontré qu'elles peuvent favoriser la production du Col-II et de l'Aggrécan chez les chondrocytes (24;25).

Les molécules de la deuxième famille, les IGFs, permettent de réguler la division cellulaire ainsi que la formation de la matrice extracellulaire des chondrocytes (26). Des études ont aussi démontré leur importance dans la production de protéoglycans. (27). Ils ont aussi un effet protecteur dans le développement de l'OA où ils diminuent les métalloprotéinases qui dégradent le collagène. Par ailleurs, il faut noter qu'il existe beaucoup d'autres facteurs anaboliques du cartilage. Ils ont un impact moins important que les facteurs de croissance, mais jouent un rôle essentiel au maintien à long terme du tissu (28).

Les facteurs cataboliques sont aussi exprimés de façon constitutive. Ils permettent, en condition physiologique normale, une dynamique dans la matrice extracellulaire des chondrocytes. Cela permet à la matrice de s'adapter, entre autres, à des changements de charges et donc, de rester optimale. Parmi les plus importants facteurs cataboliques, il y a les protéases. Il s'agit des différentes enzymes qui sont responsables de la dégradation directe de la matrice extracellulaire. Ainsi, les protéoglycans sont principalement dégradés par les «disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif» ADAMTS (29;30) et les collagènes par les «matrix metalloprotéinases» MMPs (21;31) qui composent la matrice. Comme autres marqueurs, il y a les molécules inflammatoires. Elles agissent principalement en modifiant le métabolisme cellulaire en favorisant la production d'autres molécules cataboliques. L'IL-1 et le TNF- α sont les principales molécules de cette catégorie. La première active un ensemble de facteurs cataboliques et bloque la production des facteurs anaboliques alors que le deuxième agit plutôt en synergie avec l'IL-1B et

amplifie alors la réponse inflammatoire (28;32;33). Comme pour les facteurs anaboliques, il existe aussi un large spectre de facteurs cataboliques qui, par l'entremise de voies différentes, favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage (28).

L'arthrose

L'OA est une maladie dégénérative caractérisée essentiellement par la dégradation du cartilage articulaire, un remodelage de l'os et une modification des molécules présentes dans la cavité synoviale. Dans notre population actuelle, elle représente la principale cause de dysfonction physique, d'atteinte à la qualité de vie et de coûts de traitements. (34) Sachant cela, plusieurs études ont été mises de l'avant afin d'approfondir les connaissances générales de cette maladie.

Les causes de l'OA :

Le vieillissement :

Dans les faits, la cause la plus probante de l'OA semble être le vieillissement. (35) Combinée au volet génétique, décrit plus loin, elles caractérisent l'arthrose primaire, qui correspond à un développement pathologique lié à l'âge et à la génétique, et l'a différenciée de l'OA secondaire, qui est davantage liée aux traumatismes et au stress sur les articulations. En termes de chiffres, cela représente 80% de la population âgée de plus de 75 ans. Les symptômes augmentent avec l'âge de même que la portée de son apparition dans les diverses articulations. Le vieillissement pourrait donc jouer sur d'autres facteurs caractérisés dans l'OA, notamment la baisse de production des facteurs anaboliques des

chondrocytes et la perte de leurs télomères qui favorise leur mort programmée. De fait, les chondrocytes de patients arthrosiques ne réagissent pas normalement aux facteurs de croissance, comme l'IGF-1 (36) qui stimule généralement la production des facteurs anaboliques (35). Cela corrèle avec le fait que l'âge avancé favorise la production de facteurs pro-apoptotiques chez les chondrocytes. Ainsi, il y a une plus grande production de facteurs, comme FAS, P53, FAS-ligand, qui favorisent la mort cellulaire programmée, ce qui implique des dommages à la mitochondrie et, par le fait même, l'apparition de l'OA (37;38).

Prédispositions et atteintes génétiques :

Le volet génétique a aussi un impact important dans la pathologie de l'OA. De fait, des études ont démontré qu'il y a un lien entre l'apparition de l'OA et des antécédents familiaux d'OA (39). L'incidence élevée de la pathologie s'avère un certain enjeu dans la caractérisation des gènes (40;41), mais n'a pas empêché d'établir, parmi d'autres, les associations du Tableau I suivant. Qui plus est, notons qu'il est possible que cet aspect génétique dans la pathologie ait une importance d'environ 50% à ce qui a trait, surtout, à son site d'apparition parmi les différentes articulations (41-43). Quant aux différentes mutations et atteintes géniques qui peuvent avoir une influence sur la maladie, c'est surtout les atteintes aux protéines de structures, comme les collagènes du cartilage qui sont problématiques. Elles affectent de façon négative, entre autres, la résistance mécanique et la qualité de l'équilibre moléculaire cellulaire et de la matrice extracellulaire, qui sont des facteurs clés à la physiologie normale. Elles ne sont cependant pas seules puisque des

mutations qui visent certains facteurs de croissance peuvent entraîner des effets similaires. Ainsi, certaines de ces mutations peuvent être la cause directe de l'apparition de l'OA, alors que d'autres ne font qu'accélérer son apparition (44;45). Notons que la mutation d'un nucléotide au niveau 5'-UTR du gène GDF-5 a démontré un phénotype similaire à l'OA, ce qui le propose comme gène favorisant l'apparition de la pathologie (2).

Tableau 1: Tableau présentant quelques gènes d'intérêts qui sont susceptibles de provoquer l'OA du genou suite à des mutations. Les informations sont tirées et adaptées de Valdes & Spector, 2008 et les références qui s'y trouvent sont celles citées par ces mêmes auteurs (46).

Abréviations	Nom du gène	Fonction attribuée à la protéine
AACT (47;48)	Alpha1 antiprotéinase antitrypsin	Inhibiteur des serine-protéinases impliquées dans la dégradation des protéoglycans.
ADAM12 (47;49)	A disintegrin and metalloproteinase domain 12	Metalloprotéinase impliquée dans la formation des ostéoclastes.
ASPN (50;51)	Asporine	Protéine extracellulaire régulatrice de l'activité du TGF- β
BMP2 (47;48)	Bone morphogenetic protein #2	Facteur de croissance favorisant la chondrogenèse et l'ostéogenèse.
COL2A1 (52;53)	Collagène de type II	Collagène de structure principal du cartilage articulaire.
COX2(PTGS2) (47;54)	Prostaglandine	Le produit de la COX-2, la PGE2, est un médiateur de la dégradation des protéoglycans dans l'OA.
GDF5 (55;56)	Growth differentiation factor 5	Membre de la famille des BMPs qui régule la croissance et la différenciation osseuse.
HLA (57-59)	Système de présentation d'antigène des lymphocytes humains.	Protéine essentielle à la présentation d'antigène au récepteur des lymphocytes T lors de la réponse immunitaire spécifique.
IL6 (60)	Interleukine 6	Cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la réduction de l'IL-1Ra: un inhibiteur de l'IL-1.
IL10 (61)	Interleukine10	Une cytokine impliquée dans la réduction de l'expression de l'IL-1.
OPG (47;48)	Ostéoprotégrine	Une protéine régulatrice de la synthèse des ostéoclastes.
VDR1 (48)	Récepteur de la Vitamine D	Récepteur nucléaire qui régule l'impacte de la vitamine D sur l'incidence et la sévérité de l'OA.

La localisation des articulations:

Par ailleurs, l'OA semble se développer à différents rythmes en fonction de l'articulation atteinte. De fait, les articulations qui ont pour fonction de supporter le poids des patients, ont tendance à développer la maladie plus rapidement que les autres articulations (62;63). Cela est essentiellement dû au stress qui est appliqué sur ces articulations et qui peut entraîner une érosion plus rapide du cartilage. Ainsi, ce sont majoritairement les hanches et les genoux qui montrent les premiers signes d'arthrose (64).

L'obésité :

Comme décrit précédemment, le stress appliqué aux différentes articulations peut influencer le développement de l'OA. Dans le cas de l'obésité, on note que les individus souffrant d'un surplus de poids appliquent constamment une charge supplémentaire sur les articulations qui les supportent. Ce poids supplémentaire est, de plus, accompagné d'un changement de posture et de l'activité physique qui, modifient la mécanique normale du genou entraînant ainsi une augmentation du risque de développer l'OA au niveau de cette articulation (65;66). Dans ce cas, on note alors un remodelage plus rapide de l'os avec un développement beaucoup plus rapide des ostéophytes (67). Mais encore, il a été démontré que les tissus adipeux près des articulations peuvent produire divers facteurs humoraux pouvant altérer le métabolisme du cartilage. On peut, notamment, y associer une certaine corrélation entre l'OA de la main et l'obésité (68).

Les traumatismes :

Dans le cas de notre pathologie, les traumatismes ont une importance très grande quant à l'incidence et la localisation de celle-ci. De fait, bien que le tissu cartilagineux soit résistant à des forces importantes, il ne l'est pas autant lorsque ces forces sont appliquées de façons répétitives (69). Des études ont mis en évidence le fait que des stress répétitifs élevés favorisaient la dégradation et la mort chondrocytaire alors qu'un stress physiologique, comme une inflammation locale, pouvait favoriser un retour à un phénotype normal (70). Ainsi, des activités sportives ou autres qui provoquent ces chocs répétitifs sur des endroits directs du corps, comme les épaules ou les genoux, favorisent une corrélation directe entre le développement de l'OA et la localisation de ces chocs (71). Par ailleurs, il est possible que certains mauvais alignements osseux ainsi que des problèmes de posture puissent être causés suite à un trauma. En effet, ces cas présentent une réorganisation des charges qui s'appliquent sur l'articulation et provoquent des altérations dans la capacité de l'articulation à nourrir sa couche cartilagineuse (72;73). Ainsi, toutes actions qui influencent les forces directes qui s'appliquent sur le cartilage et qui provoquent de l'instabilité au niveau de l'articulation, au niveau du poids et des liens muscles-tendons-os par exemple, résultent en facteur d'incidence de l'OA.

Les changements provoqués par l'OA :

Maintenant que les différentes causes de l'OA ont été présentées, il est intéressant de s'attarder à son effet au niveau des articulations. Puisque le phénotype peut varier d'une articulation à l'autre, la présente étude portera sur la gonarthrose. Ainsi, l'étude portera sur les changements macroscopiques que provoque l'OA, suivi des changements moléculaires au niveau de la matrice extracellulaire des chondrocytes et finalement, des changements cellulaires dans les chondrocytes.

Changements macroscopiques :

Dans les premières étapes du développement de l'arthrose, il est possible de constater des changements macroscopiques au niveau des articulations. En effet, le cartilage articulaire, généralement lisse, commence à se dégrader et à s'effriter, ce qui permet d'apercevoir un relief rugueux à sa surface. Cette observation n'est cependant visible qu'au microscope pour le stade précoce de l'arthrose. Les changements visibles à l'œil nu et en radiographie ne reflètent que les stades tardifs de l'arthrose, là où les dommages sont plus importants. Ainsi, à mesure que cette érosion se perpétue, l'os sous-chondral devient exposé et des lésions importantes apparaissent sur le cartilage. Face à cela, les chondrocytes se multiplient afin de compenser leur perte de matrice. Une formation d'ostéophytes dans les parties latérales externes des articulations se produit alors, ce qui consiste à une accumulation de matrice cartilagineuse et fibreuse qui a été recouverte d'os (74).

Formation des ostéophytes :

Les ostéophytes sont des excroissances osseuses qui apparaissent aux extrémités des articulations lors du développement de l'arthrose. Selon les études, ces formations osseuses surviennent à la suite de l'entrée de vaisseaux sanguins dans la couche basale du cartilage en dégénérescence et suite à une accumulation de réparation de microfractures de l'os sous-chondral aux extrémités de l'articulation (75). Ce faisant, cela débute avec une fusion entre le périoste de l'os et le cartilage articulaire, ce qui permet l'arrivée de vaisseaux sanguins (76;77). Le nouveau tissu qui se forme à cet endroit est caractéristique d'un tissu cartilagineux, mais riche en collagène de type I et il produit des protéoglycans non adaptés à faire des agrégats (78;79). De plus, il a été démontré que les ostéophytes peuvent être générés *in-vitro* et où ils produisent du TGF- β qui stimule la production de collagène et de protéoglycans (80;81). En somme, les ostéophytes sont un tissu cartilagineux différent du cartilage articulaire. Leur forme change aussi la cinématique des articulations dans lesquelles elles apparaissent. Elles modifient les charges sur le cartilage et cela peut permettre de ralentir, temporairement, le développement de l'arthrose dans l'articulation (82).

Changements moléculaires :

Au niveau moléculaire, l'érosion du cartilage articulaire, décrite précédemment, se traduit par des changements moléculaires et ce, principalement dans la matrice extracellulaire. Dans les premières étapes, on note une accumulation d'eau dans la matrice. Cela se produit lorsque la matrice fibreuse, notamment les réseaux de protéoglycans et de collagènes, commence à faiblir et permet l'entrée de l'eau entre les liaisons (78;83). De plus, selon différentes études, surtout chez le modèle canin, on note que les protéoglycans ont tendance à se séparer plus facilement de la matrice et ainsi être les premiers à faiblir. D'une façon plus précise, l'entrée d'eau dans le cartilage déstabilise l'équilibre des protéoglycans en favorisant la production de chondroïtin sulfate par rapport au keratan sulfate, ce qui diminue la qualité et l'efficacité des liaisons entre les protéoglycans (84). Ainsi, la matrice extracellulaire des chondrocytes commence à se dégrader sans qu'il y ait de signes apparents au niveau macroscopique/radiologique; c'est le stade précoce de l'OA (78;83;85). Par ailleurs, à cette étape, des études ont démontré que les chondrocytes réagissent à ce changement en produisant un ensemble de molécules, tant anaboliques que cataboliques (Voir *Figure 3*). Les chondrocytes produisent une grande quantité de protéoglycans et de collagènes et essaient de maintenir l'intégrité de la structure, ce qui explique l'absence de signes macroscopiques à cette étape (78;86;87). À mesure que la pathologie se développe, les liens entre les différents protéoglycans continuent de se détériorer et l'eau, qui avait jusque-là tendance à s'emmagasiner dans la chaîne principale de protéoglycans, commence à s'échapper de la matrice extracellulaire. De plus, le profil d'expression des collagènes par les chondrocytes est altéré et favorise la formation le

collagène de type I plutôt que le type II normalement exprimé (78). La résultante est une perte de structure, de dynamique biomécanique et l'érosion du cartilage.

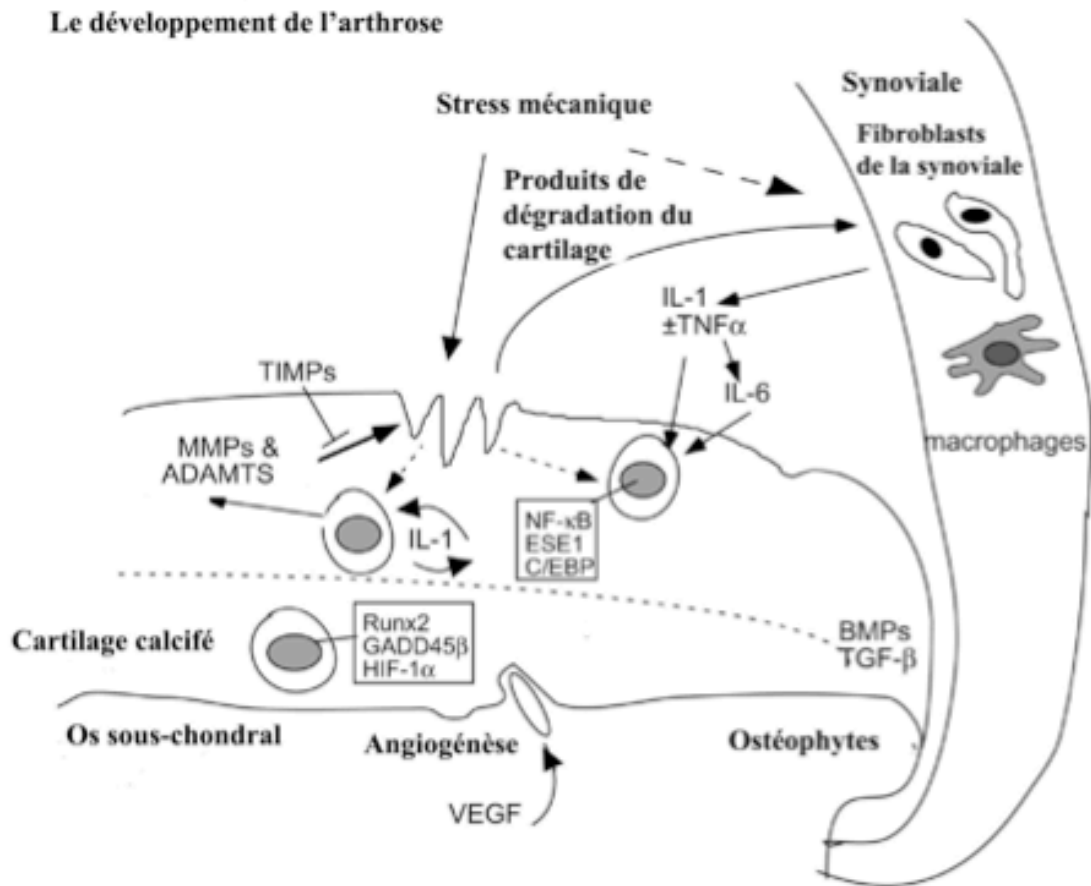


Figure 3: Les principales interactions moléculaires entre les différentes cellules impliquées dans la destruction du cartilage dans un contexte d'OA. Cette figure reflète la destruction du cartilage articulaire suite à un stress mécanique et à l'implication des différentes molécules de signalisation / facteurs de transcriptions reliées à l'OA. La figure a été tirée et adaptée de Goldring et Marcu, 2009 (88).

Changements cellulaires :

Comme il a été possible de le constater, l'OA engendre plusieurs changements dans la matrice extracellulaire autour des chondrocytes. Or, ces changements sont associés à la rupture d'un équilibre entre la production de facteurs anaboliques et cataboliques par ces cellules. Dans un état physiologique normal, la matrice extracellulaire est dans un état dynamique, c'est-à-dire qu'elle se forme et se dégrade constamment. Afin de maintenir cet équilibre, diverses protéines seront produites par les chondrocytes. Du côté anabolique, les collagènes et protéoglycans forment la base de la structure du cartilage alors que du côté catabolique, il est d'abord possible de voir les protéines de la famille des MMPs puis celle des agrécanases (89-92).

L'expression et la production des MMPs sont augmentées dans l'OA. En état pathologique, des études *in vitro* ont démontré que leur activité était aussi augmentée. En termes de fonctionnement dans l'OA, les protéines MMP-1, MMP-8 et MMP-13 se chargent de dégrader les fibres de collagènes primaires en fragments secondaires qui seront par la suite dégradés par les MMP-2, MMP-9, MMP-3 et la cathepsine B. Il faut aussi noter l'importance de la MMP-13 qui s'avère être l'une des plus importantes pour l'OA à cause de son affinité pour le collagène de type II. Or, certaines études *in vitro* ont démontré que d'autres protéines, comme l'Aggrécan, pouvaient être une cible substituant des MMPs. À vrai dire, la surexpression de ces protéines peut provoquer une dégradation complète du cartilage.

Ensuite, les aggrécanases ont, quant à elles, une implication directe dans la dégradation de l'Aggrécan extracellulaire. De façon plus précise, les ADAMTS-4 et ADAMTS-5 semblent avoir l'implication la plus importante pour la dégradation de cette molécule puisque, selon des études *in vitro*, elles peuvent dégrader l'Aggrécan à cinq sites de clivage spécifiques. Cela provient de la découverte de leur mécanisme d'action identifié comme étant «désintégrine et métalloprotéinase A avec motifs thrombospondine» ou ADAMTS (93). Dans leur cas, les domaines thrombospondines servent de site de régulation, en modifiant la qualité des liaisons ligand-récepteur (94), afin de contrôler le site catalytique (16). Dans le phénotype de l'OA, ces principales enzymes portent généralement comme nomenclature les noms d'«aggrécanase-1» (ADAMTS-4) (95) et d'«aggrécanase-2» (ADAMTS-5) (96). La première ne possède qu'un site de régulation thrombospondine alors que la deuxième en possède deux (voir *Figure 4*).

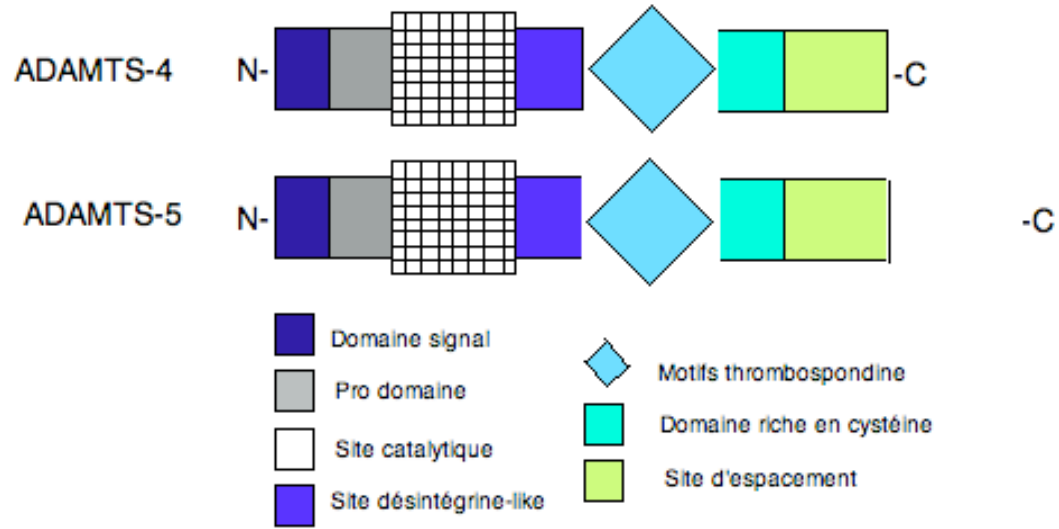


Figure 4: Cette figure présente la structure des ADAMTS-4 et ADAMTS-5. Les deux protéines sont composées, dans l'ordre, d'un domaine signal, d'un pro domaine, d'un site catalytique, d'un site désintégrine-like, d'un site d'espacement suivi de motifs thrombospondines. Figure tirée et adaptée de Huang K et al. 2008 (15).

Différentes études ont démontré que les ADAMTS avaient le potentiel de diminuer l'Aggrécan dans le contexte de l'OA (97). Mais encore, leur inhibition semble offrir un potentiel thérapeutique face à cette pathologie. Cela a notamment, été démontré dans des modèles cellulaires et murins (98-100). Ainsi, les différentes recherches actuelles portent sur des inhibiteurs potentiels des aggrécanases en tant que médicaments pouvant modifier la maladie. Différentes molécules ont déjà été identifiées, comme la partie C-terminal de la fibronectine, mais d'autres études doivent encore en valider l'efficacité (101-104). Par contre, au niveau du développement de l'OA, il est important de noter que la perte de l'Aggrécan, qui est une des premières molécules à être dégradée, engendrée par l'activité des aggrécanases pourrait s'avérer être une étape réversible. De fait, des études utilisant

l'IL-1 et du cartilage de nez, qui provient de la crête neurale, ont permis de démontrer qu'il n'y a pas une dégradation aussi complète des collagènes que chez le cartilage hyalin articulaire du genou (105;106).

À ce qui a trait aux facteurs qui modulent l'expression des aggrécases, notons que ces protéines semblent être affectées par les mêmes facteurs qui facilitent le développement de l'OA. Ainsi, l'expression des ADAMTS-4 et ADAMTS-5 semble être favorisée par les molécules telles que l'IL-1 α , IL-1 β et le TNF- α . L'ADAMTS-4 paraît, cependant, beaucoup plus sensible à ces molécules que l'ADAMTS-5 (107-110). De plus, les études portent à croire que l'ADAMTS-5 est exprimée de façon beaucoup plus constitutive, aidant au maintien de l'équilibre anabolique/catabolique de l'Aggrécane chez les chondrocytes, alors que l'ADAMTS-4 est plus inductible, bien qu'une expression basale ait été identifiée (110;111).

Différents médiateurs contribuent à modifier l'équilibre de synthèse des chondrocytes. L'IL-1 est parmi l'une des molécules les plus importantes dans la stimulation des facteurs cataboliques. Cette cytokine, exprimée par une variété de cellules dont les synoviocytes et les chondrocytes, (112;113) permet l'activation, chez les chondrocytes, d'enzymes de dégradation qui sont, en temps normal, réprimées par la cellule (114;115). De plus, pour le processus de régulation, il y a deux molécules qui, à leur tour, aident à la production de facteurs anaboliques. Ainsi, les molécules TIMP et le «Plasminogen activator inhibitor-1» permettent de maintenir une production stable de facteurs anaboliques (116).

Elles sont exprimées de façon constitutive et sont aussi stimulées lorsque des facteurs de croissance sont présents dans le milieu des chondrocytes (117;118). Toutefois, lorsque leur expression diminue, la voie catabolique a une plus grande facilité à prendre le dessus et il s'en suit la dégradation du cartilage (119).

Le traitement de l'OA :

Comme les causes de l'OA sont multiples, il n'existe actuellement aucun traitement qui permet de guérir cette pathologie ou de la prévenir. Par contre, certains sont mis de l'avant afin de diminuer les symptômes associés, et ainsi, améliorer la qualité de vie des patients. Ces traitements se classent essentiellement en trois catégories : les non pharmacologiques, les pharmacologiques et les traitements pouvant modifier la maladie.

Les traitements non pharmacologiques :

Les traitements non pharmacologiques sont essentiellement des traitements qui permettent d'améliorer le quotidien de vie des individus. Ces traitements servent donc à apaiser un facteur ou une situation qui fait en sorte que la douleur provoquée par l'arthrose s'en voit diminuer. On peut donc penser à l'exercice qui sert à contrer l'obésité. Cette activité permet de diminuer la charge appliquée sur l'articulation et ainsi améliorer la qualité des tendons, des muscles et autres qui sont généralement diminués dans cette condition. Leur amélioration augmente alors la qualité de vie générale des patients (120-122). Dans la même optique, l'utilisation d'appareils, telle qu'une cane, permet de diminuer

la charge sur l'articulation et donc, de diminuer la douleur (123;124). Dans un spectre similaire, l'ajout d'orthèse permet de rétablir partiellement la dynamique des articulations, principalement au niveau plantaire et du genou. Ces traitements non pharmacologiques permettent alors un soulagement significatif, quoique temporaire, de la douleur tout en permettant une augmentation du niveau d'activité des patients (125-127). Par ailleurs, divers autres traitements permettent de soulager les patients. Que ce soit par la chaleur, l'acupuncture ou autre, ces traitements ont tous pour objectif de réduire la douleur et d'améliorer la qualité de vie sans pour autant traiter la maladie. Or, comme dernier recours non pharmacologique, il y a la chirurgie de l'articulation, mieux connue sous la technique de l'arthroplastie. Elle consiste à remplacer, partiellement ou totalement, la surface cartilagineuse et osseuse qui fait face à l'articulation par une prothèse synthétique. Son taux de succès est élevé et ses succès répétés démontrent un soulagement presque complet de la douleur. (128)

Les traitements pharmacologiques locaux:

Lorsque la douleur est importante, différents agents pharmacologiques peuvent être utilisés afin de diminuer les symptômes de la maladie. Dans un premier temps, les médicaments dits topiques peuvent être employés. Par exemple, la Capsaïcine (129), qui est prescrite sous forme de crème, est appliquée de façon locale, et peut affecter le système nerveux local afin de diminuer l'influx nerveux associé à la douleur. Bien qu'intéressants, ces traitements ont une efficacité mitigée puisque des produits placebo ont des effets similaires et que certains produits ont des effets secondaires indésirables, comme des

démangeaisons (130-132). Des crèmes contenant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont aussi été mises au point. Elles ont généralement une efficacité supérieure, mais les degrés d'absorption de l'agent pharmacologique peuvent varier d'un patient à l'autre et d'une crème à l'autre selon sa formulation (133;134).

Les traitements pharmacologiques systémiques :

Cette catégorie est essentiellement composée de produits non narcotiques en vente libre comme l'acétaminophène, un antidouleur, qui produit un effet de soulagement similaire aux AINS sans pour autant créer les mêmes effets secondaires. Ils sont cependant limités puisqu'ils n'offrent pas de traitements anti-inflammatoires, contrairement aux AINS (135;136). De toute évidence, la seconde catégorie de traitements dans cette catégorie est les AINS. Il en existe deux classes, ceux qui inhibent à la fois la Cox-1 et la Cox-2 et ceux qui inhibent que la Cox-2. Les deux ont des effets similaires, mais la première provoque l'inhibition de la Cox-1 dans l'estomac, ce qui crée des douleurs abdominales liées à l'irritation gastrique. C'est pour cette raison que les inhibiteurs spécifiques à la Cox-2 ont été développés, dans le but de diminuer la douleur et l'inflammation sans avoir de douleurs au niveau de l'estomac. Ces derniers sont cependant associés à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires (137).

Les traitements pharmacologiques par corticostéroïdes :

Ces produits n'affectent pas directement la maladie, mais empêchent les infiltrations de cellules immunitaires dans la cavité synoviale en bloquant les molécules d'adhésion. Ils diminuent aussi l'inflammation et la douleur. Il faut cependant les administrer par une injection intra-articulaire, ce qui provoque un inconfort chez les patients. Aussi, ils ne peuvent pas être administrés de façon trop importante puisqu'ils peuvent créer des dommages importants aux cellules lorsque présents en trop grande quantité (35;138).

Les traitements qui modifient la maladie :

Les produits qui modifient la maladie essaient de changer le phénotype de l'arthrose. Pour ce faire, ils vont généralement tenter de modifier l'expression cellulaire afin de corriger le déséquilibre anabolique/catabolique dans l'articulation. Plusieurs sont encore au stade des études *in-vitro*, mais très peu en sont au stade clinique. L'acide hyaluronique et la majorité de ce type de traitement sont administrés de façon intra-articulaire et modifient les symptômes de la maladie, c'est-à-dire qu'ils diminuent la douleur et améliorent la mobilité. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas connu, des études ont mis de l'avant ses capacités anti-inflammatoire, de lubrification de l'articulation et de stimulation des synoviocytes pour qu'ils produisent de l'acide hyaluronique (35;139;140). De plus, plusieurs traitements expérimentaux veulent modifier la présence des cytokines et aider le métabolisme en ajoutant des facteurs de croissance. L'ajout d'inhibiteur à l'IL-1, comme l'IL-1Ra, est actuellement tenté de façons diverses (141-143). La thérapie génique est aussi mise de l'avant dans cette optique afin que les cellules

produisent plus d'inhibiteurs à l'IL-1 (144). Un autre traitement prometteur est la licofelone qui a été décrite comme pouvant diminuer le développement de l'OA en diminuant la dégradation du cartilage dans le modèle canin. Mais encore, son effet semble plus important lorsque la progression de la maladie est rapide chez les sujets. L'ensemble des traitements *in-vitro* de ces traitements démontre l'importance de l'impact potentiel qu'ils auront sur l'épidémiologie de la pathologie (145). Outre le cartilage, certains de ces médicaments ciblent également la membrane synoviale, en modulant principalement les cytokines et l'os sous-chondral, afin d'y diminuer les facteurs de résorption osseuse ou en stimulant sa formation (145).

Le GDF-5

La principale molécule identifiée dans cette étude est le GDF-5. Elle fait partie de la famille des BMPs et de la superfamille des TGF- β , molécules qui interagissent avec des récepteurs sérine-thréonine kinase présents à la surface cellulaire (2;3;146). Ces molécules favorisent également la croissance, le maintien et la réparation du cartilage articulaire (147-151). Le GDF-5 est principalement impliqué puisque son expression affecte les premières étapes du développement. On y attribue un effet au niveau du cartilage des os longs, là où il y a une grande formation de matrice osseuse et dans les articulations, à la fin du développement embryonnaire (2;3;148;152). Des études plus approfondies à partir d'un modèle murin, ont aussi démontré que le GDF-5 régule la formation des articulations, la croissance et la différenciation chondrocytaire (153). De plus, le GDF-5 est exprimé au cours de la vie adulte mais son effet physiologique demeure inconnu. (154). Aussi, la présence de mutations dans la séquence se traduit par des pathologies importantes, notamment au niveau des articulations et de la formation osseuse, ce qui entraîne, essentiellement, des malformations osseuses et articulaires (155;156).

Le GDF-5 a justement été identifié dans des mutations spontanées, dans un contexte OA. Dans ces différentes études, une corrélation a été observée entre l'apparition de l'OA et la présence de mutations spontanées dans le gène codant pour le GDF-5 (154;157). Aussi, au niveau de l'OA, on note que des mutations, principalement dans la section 5'-

UTR, provoquent un phénotype similaire à l'OA chez l'animal indiquant, ainsi, que la régulation du gène GDF-5 est importante. Cette mutation provoque, notamment, une dysplasie osseuse et elle favorise l'apparition de l'OA de la hanche (158;159). Cette association se base d'abord sur une mesure d'expression combinée à la luciférase qui a démontré un effet direct de la mutation sur l'expression du GDF-5 *in vitro*. Au niveau clinique, l'expression de GDF-5 est diminuée d'environ 27% chez les patients OA comparativement aux sujets normaux (154;157). De façon plus précise, les différentes études *in vitro* présentent le GDF-5 comme étant un facteur pouvant faciliter l'activité chondrogénique et la croissance des chondrocytes (159) de même qu'ostéogénique à travers la voie de signalisation des Smads (Voir *Figure 5*) (160-163).

directe dans le développement chondrocytaire et la réparation du tissu osseux, le GDF-5 s'avère une molécule intéressante à examiner dans le contexte de l'OA.

Le modèle Pond-Nuki :

Au cours de l'étude proposée, des essais sur des cellules provenant d'un modèle canin seront effectués. Ce modèle sert à simuler le développement de l'OA. Il consiste essentiellement à effectuer une lacération chirurgicale du LCA afin de perturber la cinématique du genou. Ce faisant, le débalancement des forces et le frottement entre le fémur et le tibia provoquent une érosion du cartilage avec un profil macroscopique similaire au phénotype observé dans l'OA. De façon plus précise, des coupes histologiques du cartilage ont démontré que l'érosion du cartilage n'était pas égale sur toute sa surface. En effet, les parties interne/centrale des os de l'articulation sont principalement atteintes. On y note des zones dénudées de cellules où il y a une érosion de la structure cartilagineuse superficielle (171). Au niveau temporel, le développement de l'OA dans ce modèle canin semble procéder de façon très similaire à ce qui est observé chez l'humain (172;173). De plus, nous y retrouvons une sécrétion de marqueurs d'inflammation, dégradation et peroxydation lipidique similaire à ce qu'il est possible de trouver chez l'humain, notamment une activation des métalloprotéinases (174) et une sécrétion de molécules inflammatoires, principalement par la membrane des synoviocytes (175). En effet, puisqu'il s'agit d'une reproduction d'une lésion fréquente au niveau canin, (176) cette approche sert de repère pour de futurs tests chez l'homme.

Objectifs

Considérant l'importance du GDF-5 pour le développement des articulations dans les différentes étapes de l'embryogenèse et l'effet positif sur la synthèse des composantes protéiques de la matrice cartilagineuse observée in vitro ainsi que sur les récentes évidences faisant du GDF-5 un gène de susceptibilité pour l'OA, l'objectif global de cette étude est d'évaluer le potentiel thérapeutique du GDF-5 dans un contexte d'arthrose chez le chien. De façon plus précise, la portion de l'étude décrite dans ce mémoire s'affaire à expliquer l'action du GDF-5 sur l'équilibre anabolique/catabolique des chondrocytes OA canins et humains.

Hypothèses

Le GDF-5 est impliqué dans la genèse des articulations dans les premières phases de la vie, mais son rôle demeure obscur chez l'adulte. Puisque des mutations dans le gène de GDF-5 confèrent à l'homme une susceptibilité à l'OA, nous avons posé comme hypothèse générale que le rôle de GDF-5 dans la vie adulte pourrait être celui du maintien de l'équilibre synthèse/dégradation du cartilage. Afin de répondre à l'objectif fixé pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse suivante: «pour maintenir cet équilibre, le GDF-5 devrait à la fois affecter les facteurs anaboliques et cataboliques du cartilage». Ainsi, il est proposé que le GDF-5 ait un effet positif sur les facteurs anaboliques, dont l'Aggrécan, alors qu'il y a un effet négatif sur les facteurs cataboliques, principalement les ADAMTS-4 et ADAMTS-5.

Chapitre 2. Matériel et méthode

Le prélèvement des échantillons à partir du plateau tibial

Pour notre étude, des chondrocytes OA de patients et de chiens ont été utilisés. Dans le cas des chondrocytes humains, huit genoux de patients atteints d'un stade chronique d'arthrose d'âge moyen de 64 ± 9 ont été transférés au Centre de Recherche dans les deux heures suivant une opération d'arthroplastie totale du genou selon un protocole approuvé par le comité d'éthique du Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

Pour les chondrocytes canins, ceux-ci ont été obtenus à partir de chiens de races différentes afin de tester le produit dans un échantillon non homogène. Ils ont un âge moyen de deux ans, un poids moyen de 25kg et traités selon le modèle Pond-Nuki (171) à l'animalerie de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal en approbation avec le comité d'éthique à la recherche. Cela implique que le genou de l'une des pattes postérieures de chaque chien a subi une rupture chirurgicale de son LCA suite à l'entrée d'un scalpel dans la partie antérieure de l'articulation. Chaque animal a ensuite été exposé, pendant huit semaines, à un effort physique comprenant des séances de jeu et de course, une diète et un traitement vétérinaire régulier afin de provoquer le développement d'un phénotype chronique d'arthrose. Ils ont été euthanasiés avec du pentobarbital sodium (Abbott Animal Health, Montreal, Qc, Canada) et les genoux ont été prélevés et traités afin de permettre les tests sur les chondrocytes.

Étude *in vivo* préliminaire

Pour effectuer l'étude préliminaire *in vivo*, des injections intra-articulaires de 300 ng/mL de GDF-5 ont dû être effectuées dans un intervalle régulier de 3 jours. Ainsi, n=5 chiens ayant subi une lacération de leur LCA ont reçu ces injections. Chaque injection a été effectuée sous anesthésie générale au Propofol (Abbott Animal Health, Montreal, Qc, Canada) en vertu du protocole adopté par le comité d'éthique à la recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur. Il y eut prélèvement de liquide synovial par l'insertion d'une seringue dans la cavité synoviale lors de la lacération du LCA, au temps 0, et lors du sacrifice après 8 semaines de traitement. Le dosage du CTX-II, ou épitope du Col-II, s'est effectué à partir d'un ensemble fourni par le fabricant (Serum Pre-Clinical Cartilaps, IDS Inc, Fountain Hills, AZ, USA). Le fragment a été dosé dans le liquide synovial en fonction des recommandations du fabricant.

Culture cellulaire

Pour ce qui a trait au prélèvement du cartilage et à l'obtention des chondrocytes, il y a d'abord eu prélèvement du cartilage, sous condition stérile, dans les deux heures suivant la chirurgie ou le décès. Les extraits de cartilage sont alors submergés dans de la pronase (1µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant une heure, puis lavés deux fois avec du PBS, pour ensuite être submergé dans de la collagénase (1µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant 16 heures. Le produit est alors filtré sur un filtre de 0,2 µm (Sarstedt Inc, Montreal, QC, Canada) et mis en culture dans des flacons de cultures 75 cm² (Sarstedt Inc, Montreal, QC, Canada).

À partir des spécimens humains et canins décrits précédemment, le cartilage des articulations a été prélevé afin d'y isoler les chondrocytes OA. Dans les deux types de spécimens, la procédure est identique de même que les conditions de digestion. Les cellules sont incubées à une température de 37°C dans un environnement de 5% CO₂. Par la suite, elles sont submergées dans des flacons de culture 175cm² (Sarstedt Inc, Montreal, QC, Canada) comprenant du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada) avec 10% de «Fetal bovine serum» (FBS) (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada) inactivé par la chaleur et 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada) (177).

La stimulation cellulaire

Une fois les chondrocytes extraits des différents échantillons et mis en culture, ceux-ci y furent incubés pendant 14 jours avec un changement de milieu de culture tous les deux jours. Cette période a été déterminée en suivant la croissance des cellules au microscope pour ainsi éviter une confluence cellulaire trop importante dans les flacons, afin de prévenir une inhibition par contact de la division cellulaire. À pleine confluence, les cellules ont été récoltées avec de la trypsine et ont été prélevées et centrifugées 1000xg pendant cinq minutes. Par la suite, le culot de cellules a été resuspendu dans 10 ml de milieu de culture DMEM 10% FBS. Les cellules ont alors été comptées avec un hématimètre et le volume de milieu a été ajusté afin d'obtenir une concentration de 1×10^6 cellules/ml. Pour la stimulation, 1 ml de cette solution a été placé dans différentes plaques, soit six puits pour les tests RT-PCR ou douze puits pour les autres dosages (BD Falcon, Ultident Inc., Montreal, Canada), à culture pour cellules adhérentes pendant 48 heures. Une fois les cellules adhérentes, le milieu de culture a été changé pour un milieu restrictif (2% FBS) pendant 24 heures afin de ralentir le métabolisme cellulaire. Finalement, ce milieu a été changé et différents puits ont reçu des concentrations de 100, 250 et 500 ng/ml de GDF-5 pendant 72 heures sans que le milieu ne soit changé. Les différents surnageants des puits ont alors été récoltés et les extraits cellulaires, adhérents aux plaques, ont été lavés avec PBS puis complètement resuspendus soit dans 100 µl de tampon Laemmli pour faire l'analyse protéique ou soit dans 1 ml de Trizol pour l'analyse par qPCR.

Analyse de l'expression protéique

Afin de doser l'expression des différentes protéines, les extraits cellulaires de même qu'une fraction du surnageant cellulaire ont été resuspendus dans un tampon Laemmli 2X (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, ON, Canada). Les extraits cellulaires ont été solubilisés dans le tampon et dilués à raison de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ après dosage par colorimétrie sur «BCA protein assay» (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada). Pour les surnageants, ils ont été dilués 1 :1 afin de respecter le protocole émis par le fabricant et la quantité de protéine a été adaptée à la même concentration (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ainsi, 8 μg de protéines (ou 8 μL) des différents échantillons ont alors migré sur un gel SDS-PAGE 10% à base d'acrylamide à 120V pendant 90 minutes. Un transfert sur une membrane de nitrocellulose a ensuite été effectué. Les membranes ont alors été rincées avec de l'eau distillée puis submergées dans une solution de blocage (1 :10 Superblock solution (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada), 1: 2 lait 2% et complété avec du TBS 1X (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) pendant 24 heures afin de bloquer les sites de liaisons non spécifiques sur les membranes.

Les membranes ont alors été exposées aux différents anticorps primaires afin d'identifier l'expression des différentes protéines. Les différents extraits cellulaires, tant humains que canins, ont été exposés aux anticorps, selon les recommandations et concentrations standards de leur manufacturier respectif, de lapin contre la protéine humaine Aggrécan (dilution 1 :100 dans du TTBS 1X), de lapin contre la protéine humaine

ADAMTS-4 (dilution 1 :1000 dans du TTBS 1X), de lapin contre la protéine humaine ADAMTS-5 (dilution 1 :250 dans du TTBS 1X) (Abcams Inc, Cambridge, MA, USA) alors que les extraits de surnageants ont été exposés à l'anticorps de lapin contre la protéine humaine aggrecan N-terminal epitope (NITEGE) (dilution 1 :100 dans du TTBS 1X) (MDBioproducts, Saint-Paul, MN, USA). Les membranes ont ensuite été rincées avec du TTBS 1X trois fois pendant 10 minutes sur plaque agitatrice puis exposées à l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre l'anticorps de lapin IgG (1 µg dans du TTBS 1X) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA). Après avoir été rincées avec du TTBS 1X, les membranes ont été submergées dans un substrat de chemiluminescence (Pierce *SuperSignal* West Chemiluminescent Substrates) (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada) afin de mesurer l'intensité lumineuse sur un film d'autoradiographie. Une fois exposées, les membranes ont été séparées de leurs anticorps par un traitement dans un «stripping buffer» (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS) pendant 45 minutes sur plaque agitatrice. Les membranes ont alors été rincées avec du TTBS 1X et l'anticorps rabbit monoclonal-anti actin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) (1µg/ml) a été incubé avec les membranes pendant une heure pour ensuite être exposé à l'anticorps goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA). Finalement, après 3 lavages de dix minutes au TTBS, le substrat à chimiluminescence a été ajouté afin de permettre une nouvelle lecture d'intensité.

Pour la comparaison et la normalisation des bandes, il y eut des temps d'expositions identiques pour les différentes conditions et leur β -actine. L'intensité des différentes bandes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) en s'assurant que les échantillons/segments d'image à analyser soient les mêmes sur chaque image et pour chaque condition. En dernier lieu, les différentes intensités ont d'abord été normalisées en fonction de leur contrôle puis ont été comparées à l'expression de la β -actine.

Analyses qPCR

L'analyse qPCR des différents échantillons a été faite à partir des chondrocytes présents aux surfaces du tibia et du fémur. Ces chondrocytes ont été submergés dans 1 ml Trizol / 1×10^6 cellules. De plus, 0,2 ml de chloroforme (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) par ml de Trizol initial a été ajouté et la solution a été mélangée 30 secondes puis centrifugée 12000xg/15 minutes. La phase supérieure a été récoltée et 0,5 ml d'isopropanol (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) a ensuite été ajouté. Les échantillons furent par la suite précipités pendant 18 heures à -80°C . Ils ont alors été décongelés puis centrifugés 12000xg/5 minutes à 4°C où le surnageant a été éliminé. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml d'éthanol 70%, pour lavage, puis centrifugé 12000xg/5 minutes.

Une fois cette extraction terminée, l'ARN a été dosée en utilisant le RiboGreen comme réactif et de l'ARN ribosomal comme standard. La méthode utilisée consiste à diluer 1 μl d'ARN dans 500 μl d'eau pure et de quantifier celle-ci avec l'affinité du RiboGreen pour l'ARN. Le mélange de Ribogreen, du tampon TE (Qiagen Inc. Mississauga, ON, Canada) et de notre ARN a permis de dresser une droite de corrélation et d'identifier la concentration de chacun de nos échantillons. Ces concentrations sont alors toutes ramenées au volume de départ et une concentration égale de chaque échantillon a été utilisée pour la transcription inverse (RT), méthode établie selon le protocole du fabricant (Qiagen Inc. Mississauga, ON, Canada). Cette partie consiste alors à mélanger une quantité

fixe d'ARN (0,5 µg), à un mélange contenant une enzyme qui dégrade l'ADN génomique (gDNA Wipeout Buffer 7X) pendant 2 min à 42°C pour ensuite mélanger le tout, dans les 5 minutes suivantes, à un mélange à RT (Quantitech Reverse Trascriptase (1µl/échantillon), Quantiscript RT buffer 5x (4µl/échantillon), RT primer Mix (1µl/échantillon)) qui sera chauffé 15 minutes à 42 °C puis 3 minutes à 95 °C. (Qiagen Inc. Mississauga, ON, Canada) Les échantillons sont alors conservés à -20°C jusqu'au dosage par PCR quantitatif.

Pour le dosage, il suffit de mélanger les produits de RT obtenus précédemment avec un mélange à SYBR Green (Qiagen Inc. Mississauga, ON, Canada) et les amorces sens et anti-sens de l'ARNm voulu (voir Tableau I). Le tout a subi une série de cycles d'amplification selon paramètres suivants : Segment 1 (2 min à 50 °C), Segment 2 (15 min à 95 °C), Segment 3 (45 cycles) (15 sec à 94 °C suivi de 30 sec à 55°C suivi 20 sec à 72 °C) et Segment 4 (courbe de dissociation).

Tableau 2: Tableau présentant les séquences des amorces utilisées afin d'amplifier les différents gènes lors de l'étape du PCR quantitatif.

Amorces canines	Amorces humains
<i>Aggrécan</i>	<i>Aggrécan</i>
(S) 5'-ACC CCT GAG GAA CAG GAG TT-3'	(S) 5'-ACT GGC GAG CAC TGT AAC-3'
(AS) 5'-GTG CCA GAT CAT CAC CACAC-3'	(AS) 5'-TCT TGG GCA TTG TTG TTG AC-3'
<i>ADAMTS-4</i>	<i>ADAMTS-4</i>
(S) 5'-CAT CAC TGA GTT CCT GGA CA-3'	(S) 5'- GAC CTT CCG TGA AGA GCA GTGT-3'
(AS) 5'-CGA TCA GCG TCA TAG TCC TT- 3'	(AS): 5'-CCT GGC AGG TGA GTT TGC AT-3'
<i>ADAMTS-5</i>	<i>ADAMTS-5</i>
(S) 5'-GGC ATC ATT CAT GTG ACAC-3'	(S) 5'-GGC ATC ATT CAT GTG ACAC -3'
(AS) 5'-GCA TCG TAG GTC TGT CCTG-3'	(AS) 5'-GCA TCG TAG GTC TGT CCTG-3'
<i>Col-II</i>	<i>Col-II</i>
(S) 5'-ATC GGG CCT GTC TGC TTC TTG TAA-3'	(S) 5'-AAC CAG ATT GAG AGC ATC CG-3'
(AS) 5'-ACA TCA GGT CAG GTC AGC CAT TCA-3'	(AS) 5'-AAC GTT TGC TGG ATT GGG GT-3'
<i>Col-I</i>	<i>Col-I</i>
(S) 5'-GAG AAA GAG GCT TCC CTG GT-3'	(S) 5'-GGC AGA CCT TGC AAT CCA TTG TGT-3'
(AS) 5'-AGG AGA ACC ATC TCG TCC AG-3'	(AS) 5'-GGC AAA CAT GGA AAC CGT GGT GAA-3'

Une mesure de la fluorescence du SYBR green a été faite en continu tout au long de l'expérience avec l'appareil GeneAmp 5700 Sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ces valeurs, ajustées en fonction du seuil de la phase exponentielle de la fluorescence, ont été utilisées aux fins d'analyses et normalisées en fonction du niveau d'expression de la GAPDH. Ces nouveaux résultats ont alors été normalisés avec l'échantillon non stimulé puis transformés en facteur d'expression.

Analyse statistique

Afin de valider les résultats obtenus au cours des différentes analyses, une analyse statistique a été faite. Dans le cas des résultats obtenus par extraction protéique, l'intensité des bandes n'a pas été compilée en fonction du nombre d'échantillon, mais bien par une simple moyenne afin de comparer les différentes conditions entre elles. Quant au qRT-PCR, une analyse statistique de Student (T) a été effectuée entre les contrôles et les différentes conditions à l'intérieur des différents gènes. Cela permet de valider la différence significative entre l'expression génique des contrôles par rapport aux échantillons testés. Le seuil de signification utilisé est $p < 0,05$.

Chapitre 3. Résultats

Validation du modèle canin

En premier lieu, il a été important de valider notre modèle Pond-Nuki en fonction des résultats expérimentaux de la littérature. Ainsi, la *Figure 6* présente la condition d'un genou canin suite aux 8 semaines d'observations après une rupture du LCA.

Dans cette figure, on peut voir une lésion au niveau du plateau tibial interne. Cette lésion expose l'os sous-chondral et est de grade 3 sur une échelle d'arthrose allant de 1 à 4. Elle mesure 0,8 cm de longueur et 0,3 cm en largeur. Sur le plateau tibial externe, près de la moitié de la surface cartilagineuse est rugueuse de façon macroscopique et correspond à une plaque d'arthrose de grade 2 faisant 1 cm².

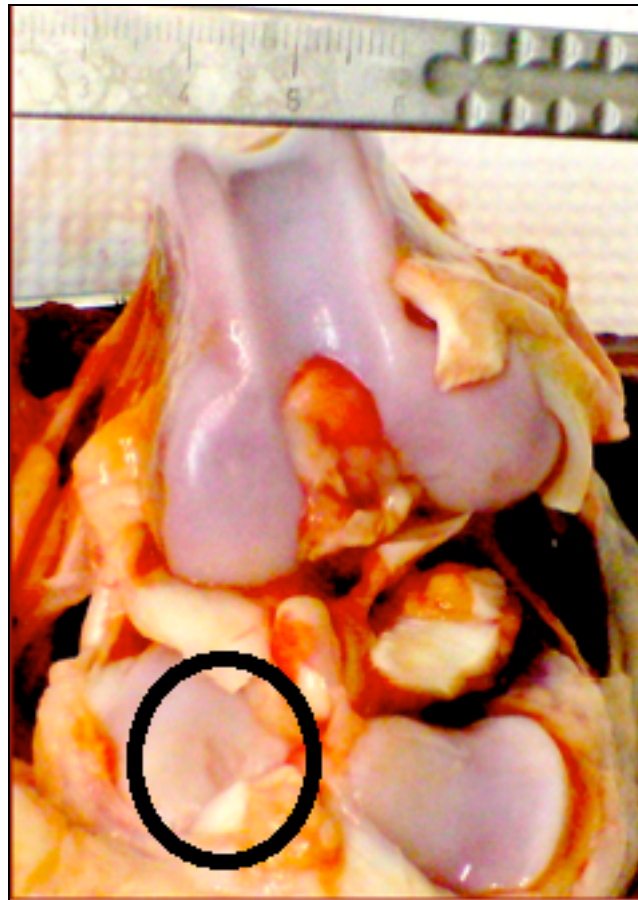


Figure 6: Photo d'un genou canin suite à 8 semaines d'effort physique normal après une lacération du LCA. La partie supérieure représente les condyles fémoraux et la partie interne est le plateau tibial. Le côté gauche de l'image représente le côté interne de l'articulation. Le cercle englobe une lésion sur le plateau interne.

Analyse de l'expression génique

Comme première étape de l'étude, l'impact du GDF-5 sur la transcription génique a été évalué. En utilisant la technique RT-PCR quantitative, il a été possible d'obtenir des données quantitatives reliées au nombre de cycles nécessaires pour détecter une fluorescence de SYBR Green. Dans la section suivante, les résultats d'expression d'ARNm des chondrocytes OA canins seront d'abord présentés puis suivront ceux des chondrocytes OA humains.

Analyse PCR des chondrocytes canins:

Dans un premier temps, l'étude in vitro sur les chondrocytes canins a été effectuée à partir de chiens ayant subi une rupture de leur LCA. Ces chondrocytes ont été incubés avec différentes doses de GDF-5 pendant 3 jours. Les extraits cellulaires de cette incubation ont été isolés dans le Trizol. Les médiateurs anaboliques et cataboliques produits par les chondrocytes et reconnus comme importants dans un contexte OA ont été analysés par RT-PCR. Ainsi, comme premier dosage, l'expression de l'ARNm de l'Aggrécan a été évaluée et le résultat est présenté à la *Figure 7* suivante.

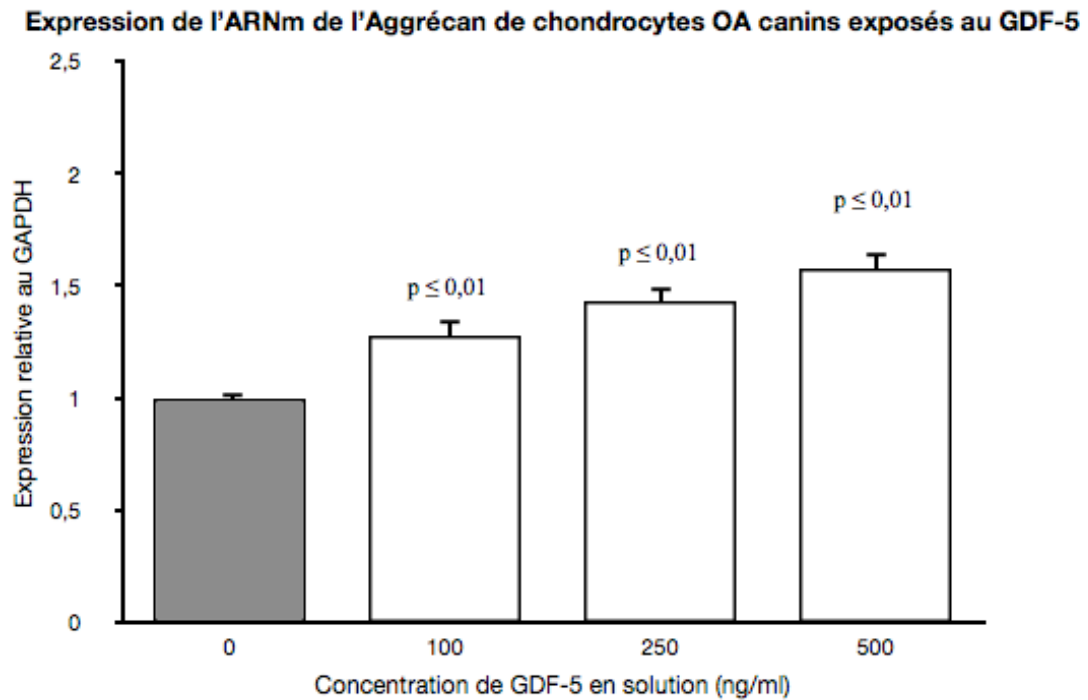


Figure 7: Expression des ARNm de l'Aggrécan, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'Aggrécan ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon $n=5$ en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Dans cette figure, on note une augmentation croissante de l'expression de l'ARNm de l'Aggrécan en fonction de la dose. Aussi, l'ensemble des doses présente un ratio d'expression supérieur au contrôle. De fait, cela se traduit par une expression de 1,28 pour 100 ng/ml, 1,43 pour 250 ng/ml et 1,58 pour 500 ng/ml. Ces différences sont toutes significatives lorsque comparées au contrôle avec $p \leq 0,01$.

En plus de cette manipulation, le dosage de l'expression des Col-I et Col-II a été effectué. Les mêmes extraits d'ADN ont été utilisés et les résultats représentant cette variation d'expression se retrouvent à la *Figure 8* suivante.

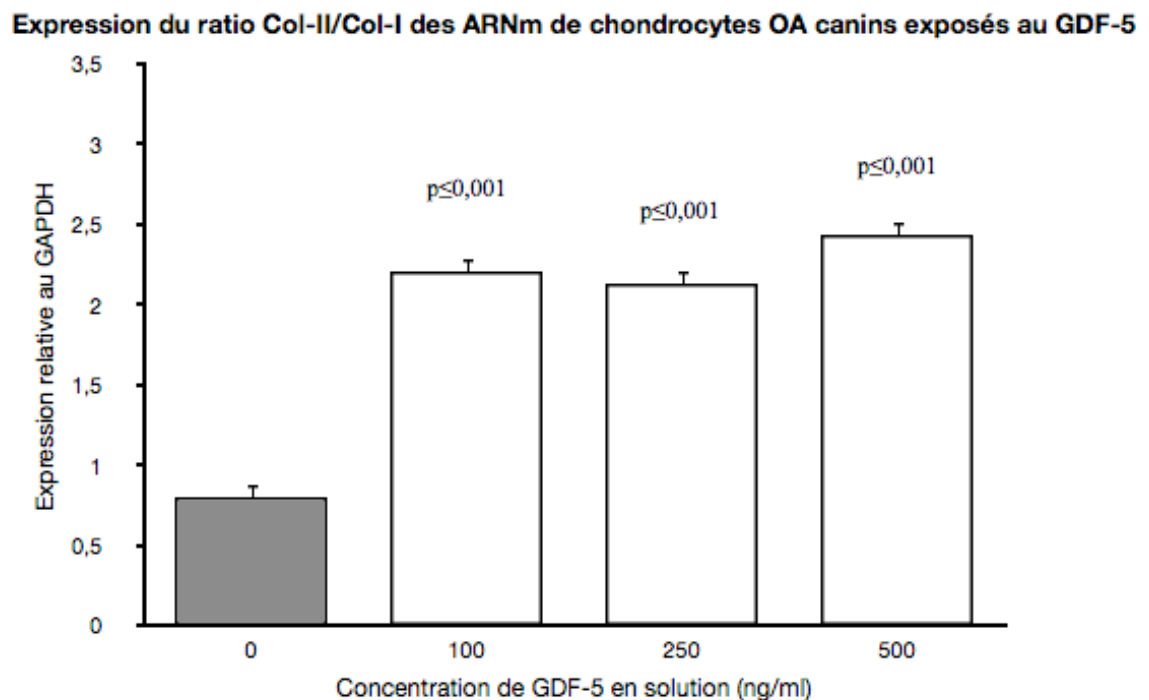


Figure 8: Expression du ratio d'ARNm des Col-II /Col-I, par la méthode SYBR Green, de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en fonction dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces Col-II et Col-I ont été utilisées et ont été normalisées avec l'expression du GAPDH. Le ratio a été fait suite à cette normalisation. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon $n=5$ en triplicat où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Nous pouvons observer une augmentation du ratio d'expression Col-II /Col-I lorsqu'il y a présence de GDF-5 et ce, pour toutes les doses lorsqu'elles sont comparées au contrôle. Cette augmentation a une tendance plateau pour les doses de 100 et 250 ng/ml pour finalement augmenter à la dose de 500 ng/ml. De façon plus précise, les ratios sont de 2,21 pour 100 ng/ml, 2,13 pour 250 ng/ml et 2,43 pour 500 ng/ml. Ces ratios représentent une combinaison d'une diminution de l'expression de Col-I combinée à une augmentation de l'expression du Col-II, mais leur variation n'est pas présentée. Une fois comparés au contrôle, ces résultats sont tous significatifs avec une P value $\leq 0,001$.

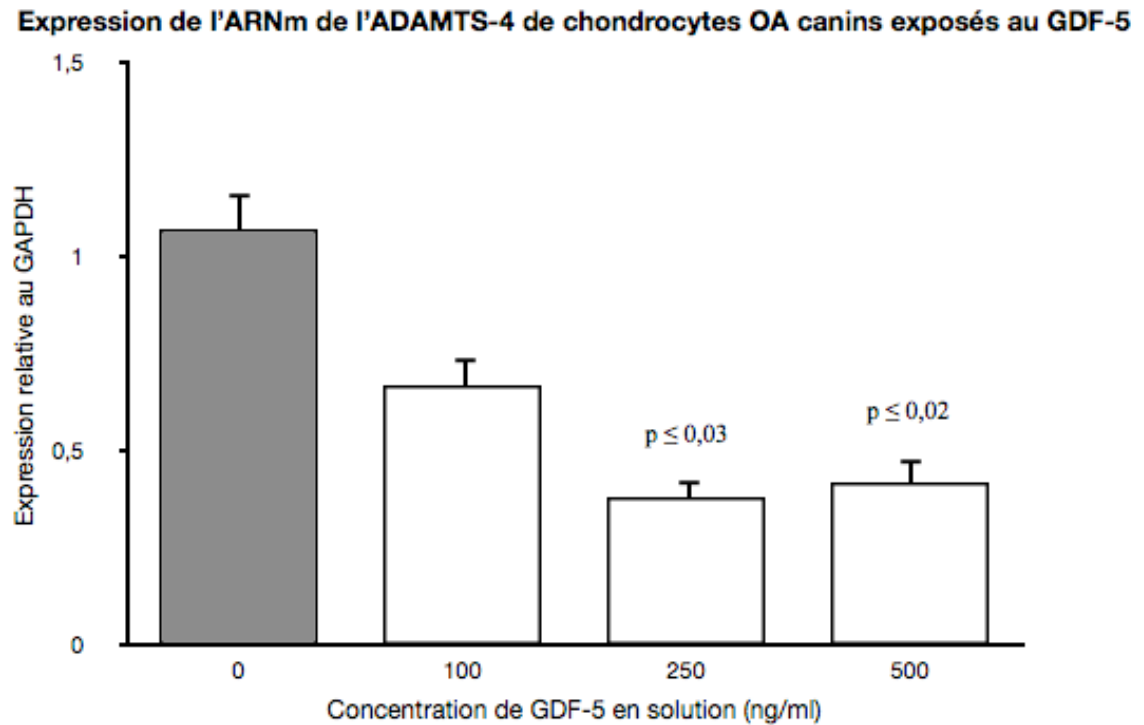


Figure 9: Expression des ARNm de l'ADAMTS-4, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'ADAMTS-4 ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon $n=5$ en triplicat où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Finalement, les extraits d'ADN ont été incubés, lors du qPCR, avec les amorces des aggrecanases ADAMTS-4 (*Figure 9*) et ADAMTS-5 (*Figure 10*). L'expression de l'ARNm de ces différentes molécules se traduit dans les figures suivantes.

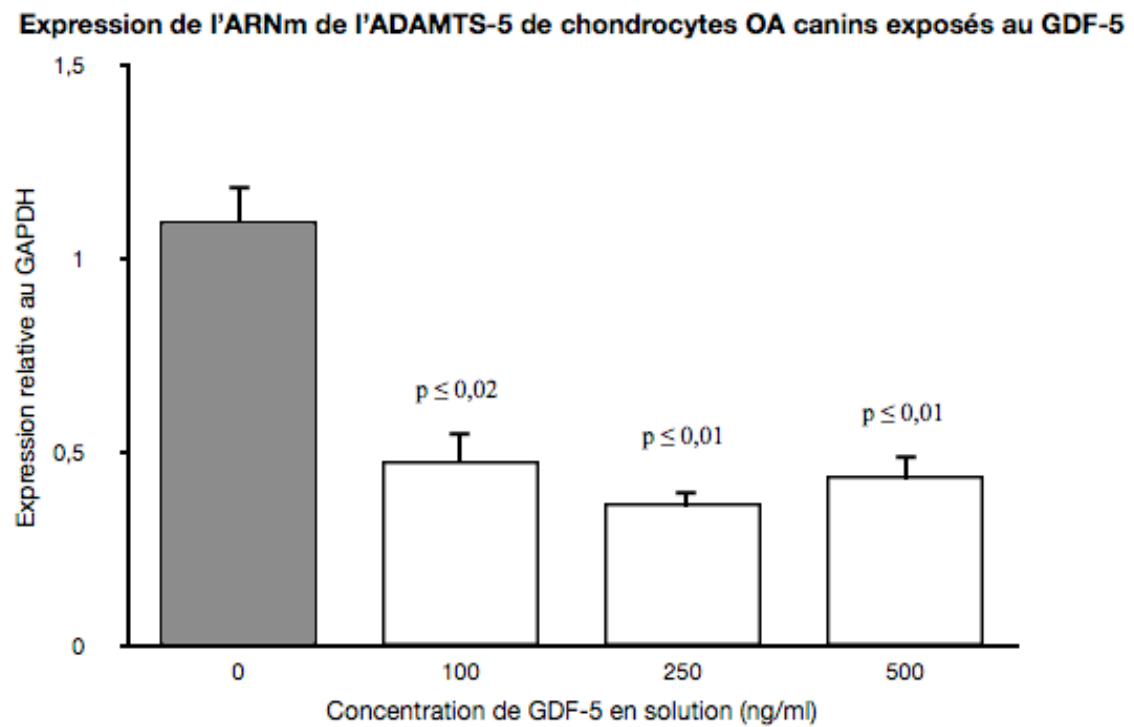


Figure 10: Expression des ARNm de l'ADAMTS-5, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'ADAMTS-5 ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon $n=5$ en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

En observant les différentes variations obtenues à travers la *Figure 9*, il est possible de noter qu'une diminution du facteur d'expression survient lorsqu'il y a présence de GDF-5, c'est-à-dire que l'expression est en dessous du contrôle, et ce, pour toutes les doses. D'une façon plus précise, la dose de 100 ng/ml présente une baisse non significative d'expression à 0,67 et cela est suivi d'une diminution significative lorsque la dose est augmentée à 250 ng/ml (0,38) ($p \leq 0,03$) et à 500 ng /ml (0,42) ($p \leq 0,02$). Dans le cas de la *Figure 10*, il y a aussi une diminution d'expression pour toutes les doses lorsqu'il y a présence de GDF-5 en culture. Cette baisse est représentée par une diminution significative du facteur d'expression à 0,48 ($p \leq 0,02$) pour la dose de 100 ng/ml, 0,37 ($p \leq 0,01$) pour la dose de 250 ng/ml et 0,44 ($p \leq 0,01$) pour la dose de 500 ng/ml.

Analyse PCR des chondrocytes OA humains

Après avoir dosé les chondrocytes OA canins, les chondrocytes des spécimens humains ont été stimulés avec les mêmes doses de GDF-5 puis, une mesure de l'expression des ARNm a été effectuée. Pour cette analyse, l'expression des ARNm de l'Aggrécan a été mesurée et ces résultats se retrouvent dans la *Figure 11* qui suit.

Les résultats de cette première figure présentent une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'Aggrécan pour toutes les doses. En fonction de la dose, on note qu'il y a une augmentation d'expression de 100 (1,24) à 250 (1,68) ng/ml pour redescendre à un niveau plus inférieur pour la dose de 500(1,12) ng/ml. On note que pour la dose de 250 ng/ml, l'augmentation est significative par rapport au contrôle avec une p value $\leq 0,02$, mais qu'elle ne l'est pas pour les autres doses.

Expression de l'ARNm de l'Aggrécan de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5

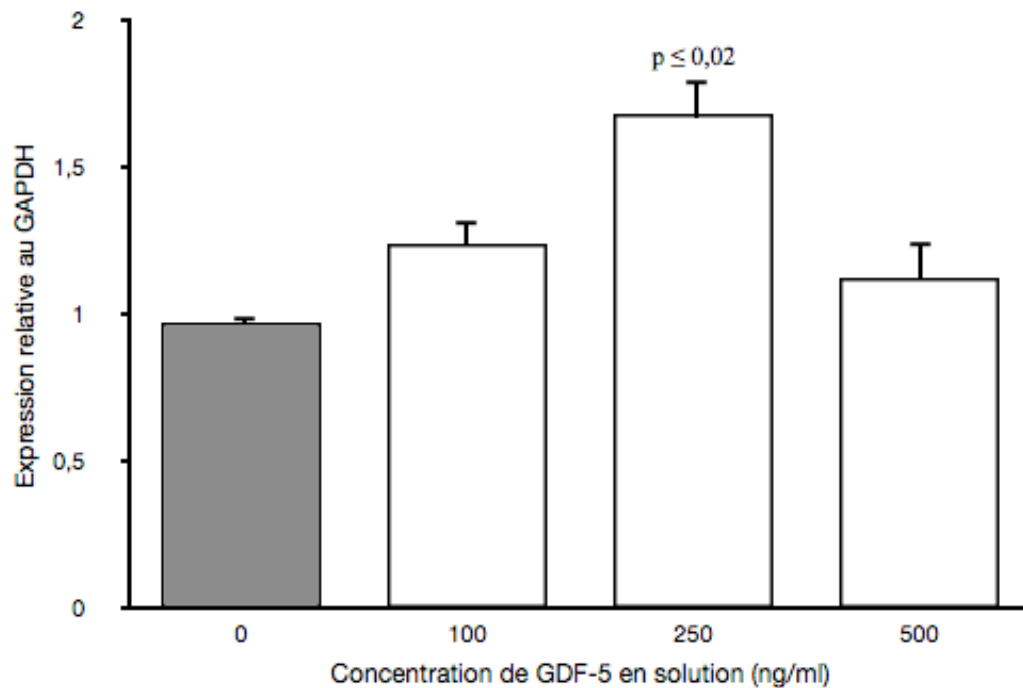


Figure 11: Expression des ARNm, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'Aggrécan ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon n=5 en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

À ces résultats ont été ajoutés ceux des protéines anaboliques Col-II et Col-I. Pour ces résultats, un ratio d'expression des ARNm du Col-II sur le Col-I a été effectué pour chacune des doses et ces ratios sont représentés dans la *Figure 12* suivante.

Expression du ratio Col-II/Col-I des ARNm de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5

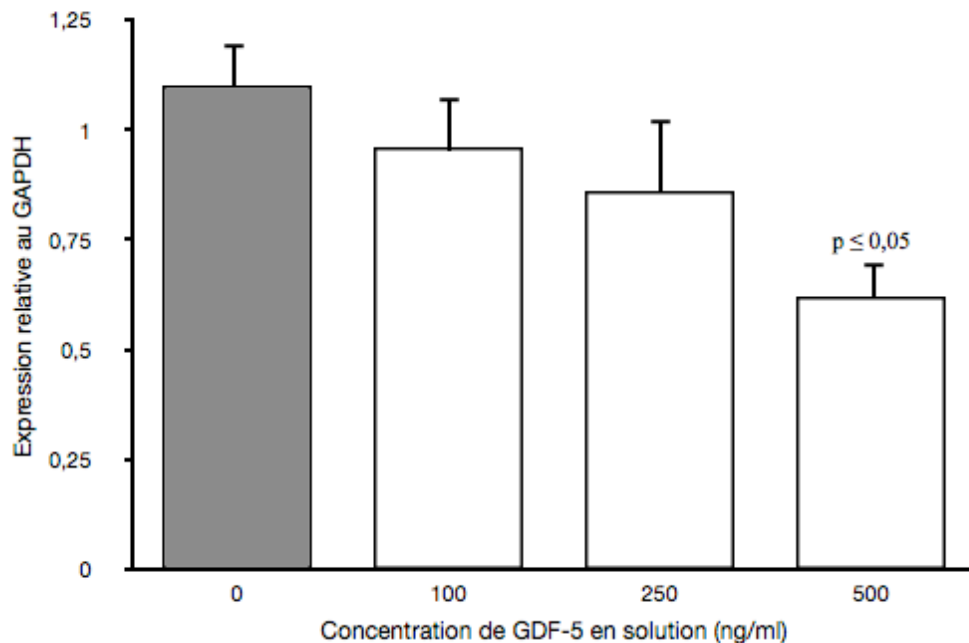


Figure 12: Expression des ARNm, par la méthode SYBR Green, de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en fonction dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces Col-II et Col-I ont été utilisées et ont été normalisées avec l'expression du GAPDH. Le ratio a été fait suite à cette normalisation. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon N=5 en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Ainsi, la *Figure 12* présente un ratio qui a tendance à diminuer en fonction de la dose.

On note, notamment, une diminution non significative pour les doses de 100 (0,96) et de 250 (0,86) ng/ml suivie d'une diminution plus importante et significative à 0,62 pour 500 ng/ml où $p \leq 0,05$.

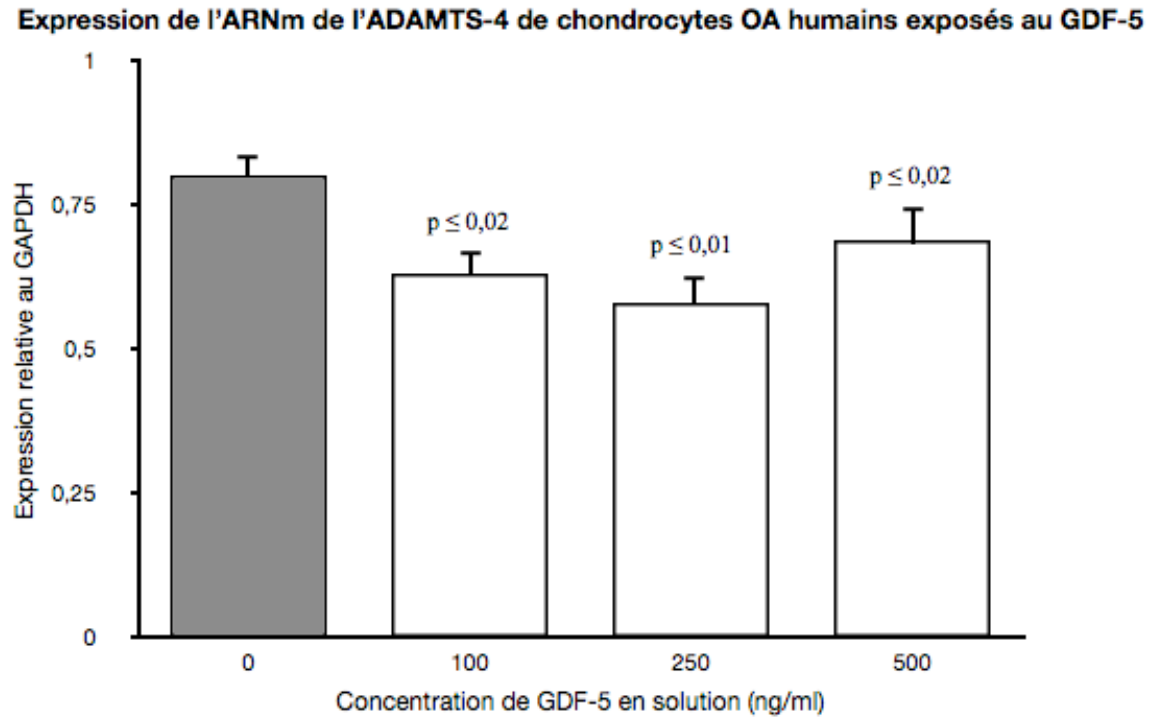


Figure 13: Expression des ARNm, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'ADAMTS-4 ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon $n=5$ en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Toujours suite à la stimulation de 72 heures avec du GDF-5, les extraits d'ARNm des chondrocytes OA humains ont été incubés par RT-PCR avec les amorces stimulant la production d'ARNm de l'ADAMTS-4 (*Figure 13*) et de l'ADAMTS-5 (*Figure 14*). Les résultats des qRT-PCR sont reflétés dans les figures suivantes.

Expression de l'ARNm de l'ADAMTS-5 de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5

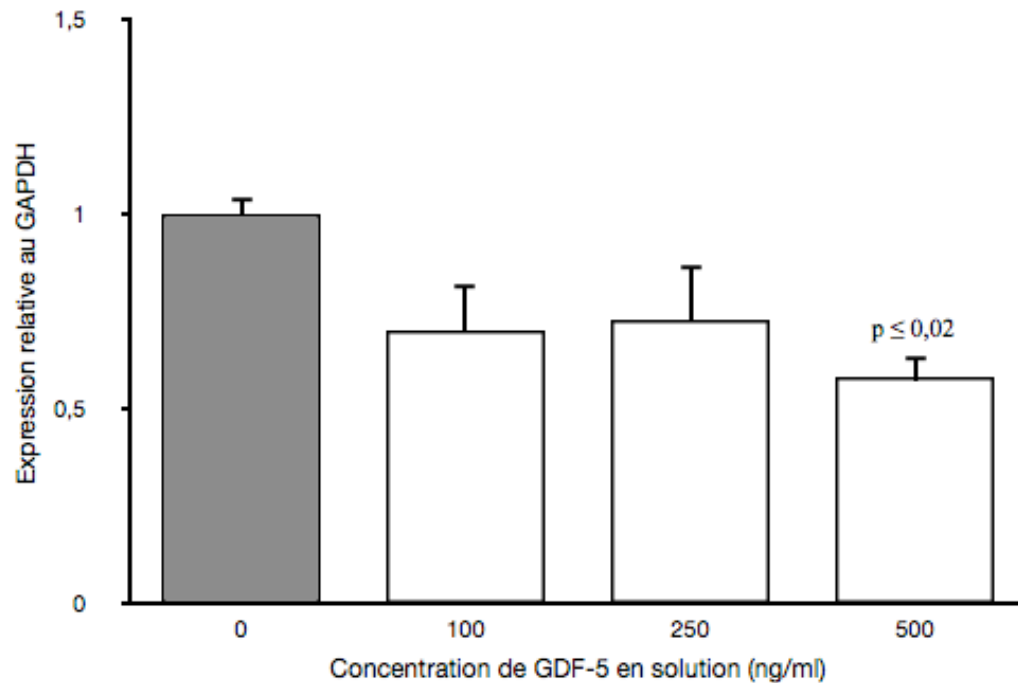


Figure 14: Expression des ARNm, par qRT-PCR avec SYBR Green, de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire. Les amorces de l'ADAMTS-5 ont été utilisées et l'expression a été normalisée avec l'expression du GAPDH. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les résultats représentent un échantillon n=5 en triplicata où chaque dose a été comparée au contrôle par un test Student T.

Ainsi, à la *Figure 13*, il y a formation d'un plateau du facteur d'expression près de 0,65 pour chacune des trois doses. Plus précisément, on note une expression de 0,63 pour 100 ng/ml, 0,58 pour 250 ng/ml et 0,69 pour la dose de 500 ng/ml. Chacune des doses présente une différence significative lorsque comparée au contrôle, notamment $p \leq 0,02$ pour les

doses de 100 et 500 ng/ml et $p \leq 0,01$ pour la dose de 250ng/ml. Aussi, la *Figure 14* présente une tendance à la diminution pour les doses de 100 (0,70) et 250 (0,73) ng/ml, mais cette baisse n'est pas significative. Or, pour la plus haute dose, il y a une baisse du facteur d'expression à 0,58 qui est significative avec $p \leq 0,02$.

Analyse de l'expression protéique

Par la suite, des analyses de l'expression protéique de l'Aggrécan et des aggrécanases ont été effectuées. Elles ont été faites à partir de différents extraits cellulaires stimulés, mais isolés dans un tampon Laemmli. Les protéines ont alors migré sur gel d'acrylamide 10% SDS-PAGE, permettant d'obtenir des profils d'expression pouvant être comparés.

Analyse d'expression protéique des chondrocytes canins:

Dans le contexte d'analyse d'expression protéique, l'analyse de l'expression des chondrocytes canins a d'abord été effectuée. Après avoir obtenu l'intensité d'expression sur film, ces intensités ont été traduites en valeurs quantitatives via le logiciel Image J et ont été comparées. La variable statistique a été éliminée puisque la technique utilisée est semi-quantitative et ne permet pas une bonne comparaison entre les variables. Ce faisant, l'anticorps primaire utilisé a été dirigé contre la protéine Aggrécan canine dont l'expression est reflétée dans la *Figure 15* suivante.

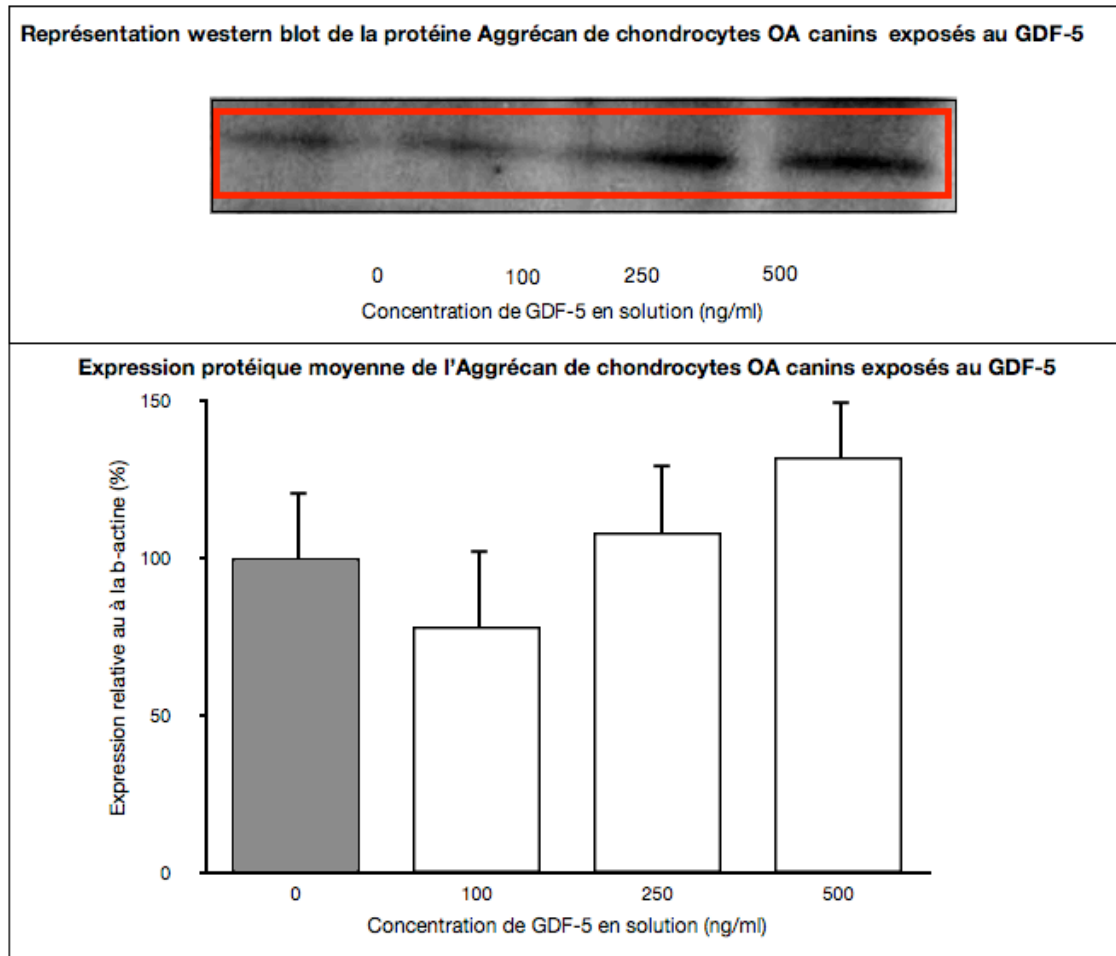


Figure 15: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine Aggrécan après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

Cette *Figure 15* présente une moyenne d'expression des différents échantillons. Dans celle-ci, on note que pour les plus hautes doses, il y a une plus grande expression de la protéine que dans le contrôle. Ainsi, l'expression d'Aggrécan a tendance à diminuer (78%) à faible dose (100 ng/ml) pour ensuite avoir tendance à remonter en présence de doses plus fortes, notamment 108% pour 250 ng/ml et 132% pour 500 ng/ml.

Par la suite, la mesure de l'expression de l'aggrécanase ADAMTS-4 a été effectuée selon la même technique. En utilisant les mêmes doses et la même procédure western blot, il a été possible de représenter l'expression de la protéine dans la *Figure 16* qui suit.

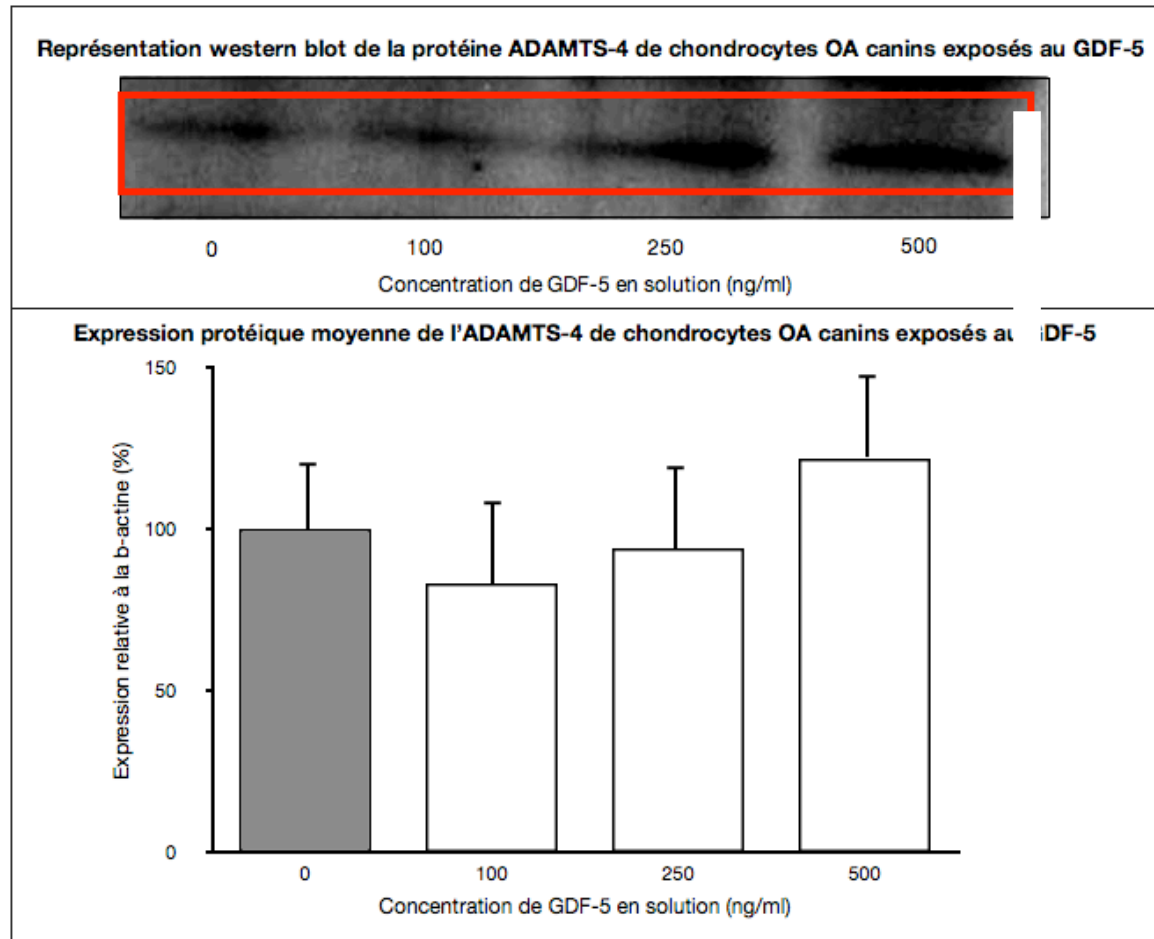


Figure 16: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-4 après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. . Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

Cette figure présente un profil d'expression moyen d'échantillons où on note une tendance à la baisse pour la dose de 100 ng/ml suivie d'une remontée supérieure au contrôle pour les doses de 250 et 500 ng/ml. Plus précisément, il y a une diminution de l'expression de la protéine pour la dose de 100 ng/ml (83%) suivie d'une augmentation continue pour les doses de 250 ng/ml (94%) et 500 ng/ml (122%).

À cette figure se rajoute celle traitant de l'aggrécanase ADAMTS-5. Après avoir utilisé la même technique tout en changeant l'anticorps primaire, il a été possible de représenter graphiquement l'expression de la protéine. Cela peut être observé à la *Figure 17* suivante.

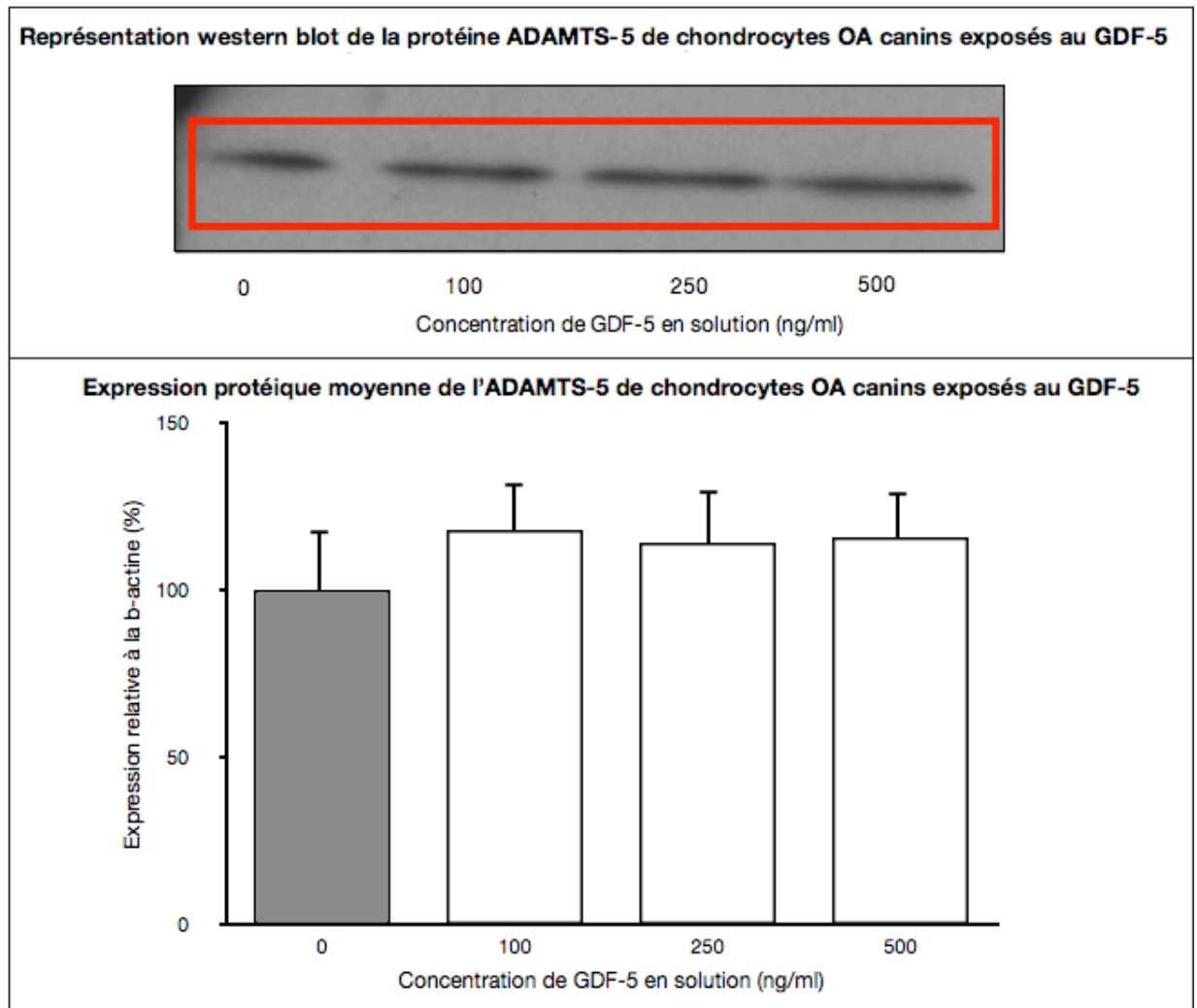


Figure 17: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-5 après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

En somme, cette figure présente une tendance à la formation d'un plateau d'expression de l'ADAMTS-5 supérieur au contrôle lorsque le GDF-5 est mis en culture et ce, peu importe la dose utilisée. De fait, après une normalisation avec la β -actin, on note que la variation entre les doses de 100 (118%), 250 (114%) et 500 (116%) ng/ml est similaire puisqu'elles ne varient pas de façon importante.

Analyse d'expression protéique des chondrocytes OA humains :

Après avoir effectué l'analyse de l'expression protéique au niveau canin, la même étude au niveau des chondrocytes humains a été effectuée afin d'établir une comparaison entre leur profil d'expression. Ainsi, la première protéine analysée a été l'Aggrécan par Western blot. La *Figure 18* suivante présente ce profil d'expression.

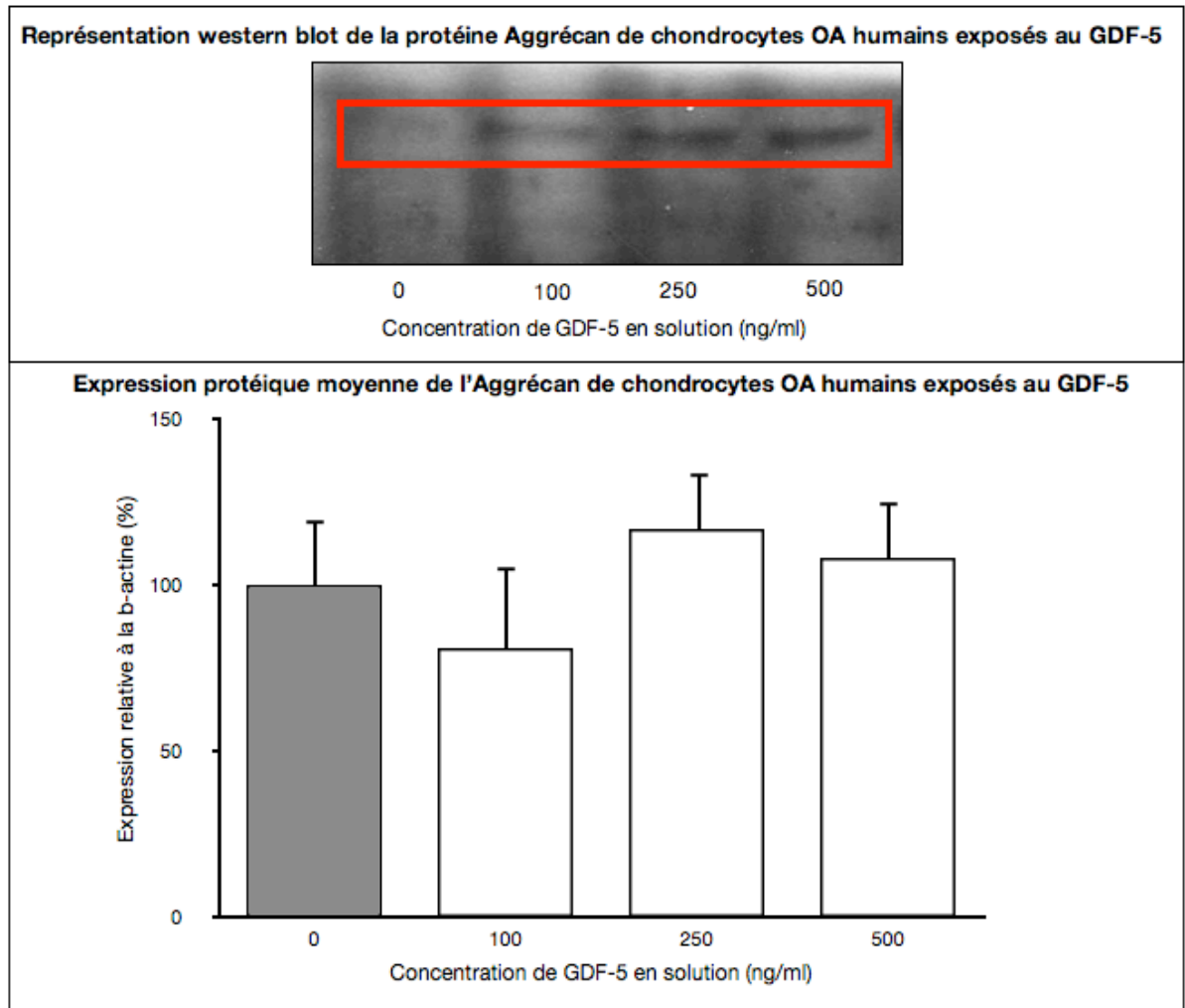


Figure 18: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine Aggrécan après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

Cette figure présente donc l'évolution de la production d'Aggrécan selon la dose de GDF-5 présente en solution de culture. En ce sens, lorsque normalisé à la β -actin, il y a une baisse à 81% d'expression pour la dose de 100 ng/ml suivie d'une augmentation au-delà du contrôle à 117% pour la dose de 250 ng/ml. La dose de 500 ng/ml (108%) présente une augmentation par rapport au contrôle, mais une diminution lorsque comparée à la dose de 250 ng/ml. Par ailleurs, une étude de l'expression protéique des aggrécanases a été effectuée sur ces mêmes chondrocytes. Toujours avec la même technique et en normalisant l'expression des différentes protéines à l'expression de la β -actine cellulaire, il a été possible de dresser des figures pour le profil d'expression de l'ADAMTS-4 (*Figure 19*) et de l'ADAMTS-5 (*Figure 20*).

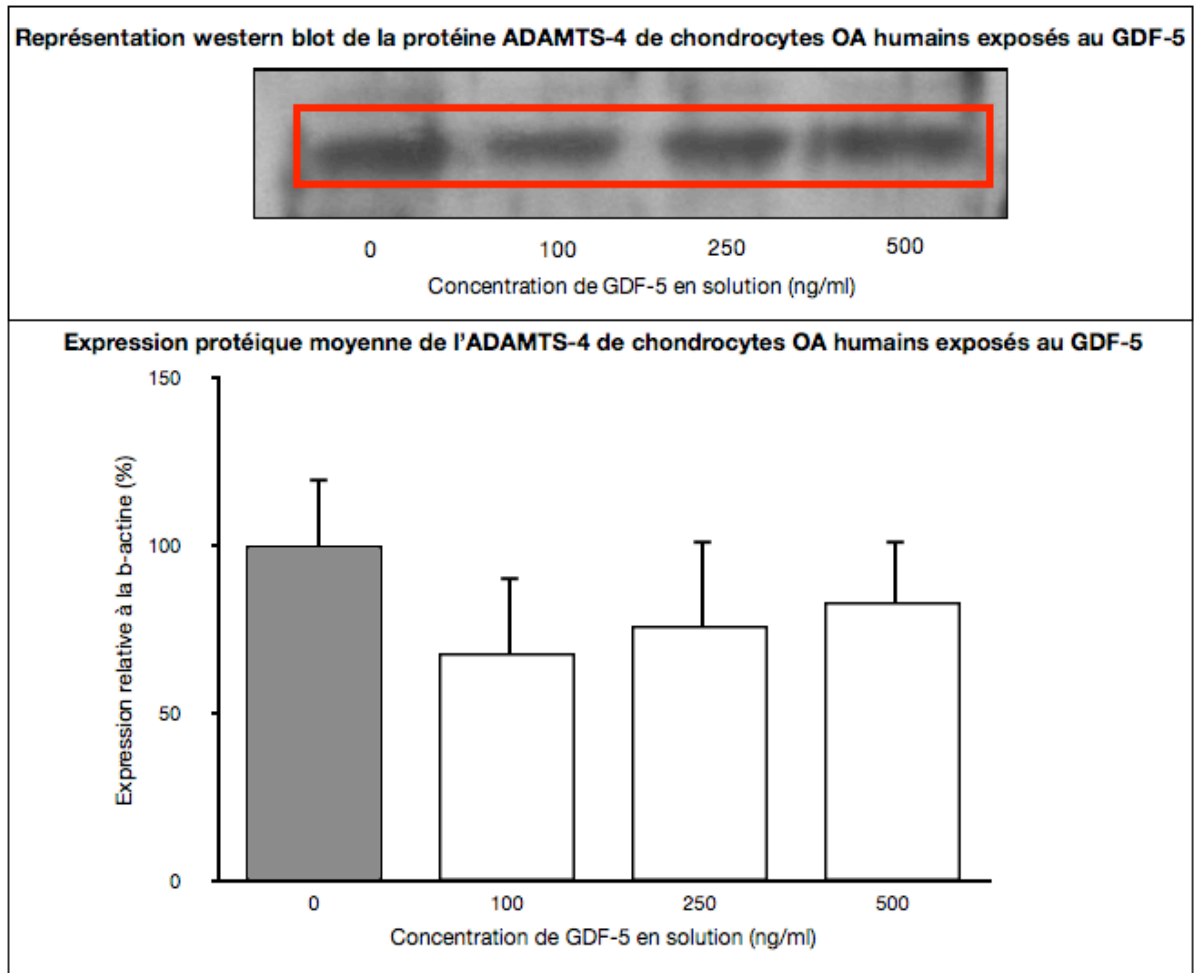


Figure 19: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-4 après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

En identifiant les profils d'expressions présentés dans chacune des figures, on note d'abord que la *Figure 19* présente une diminution de la protéine ADAMTS-4 pour toutes les doses. Qui plus est, cette diminution est moins importante au fur et à mesure que la dose augmente. Ainsi, on constate que l'expression, normalisée à la β -actine, diminue à 68% pour 100 ng/ml et tend à remonter légèrement pour les doses de 250 ng/ml (76%) et 500 ng/ml (83%) lorsque comparée au contrôle. Quant aux résultats de la *Figure 20* qui suit, on note aussi une diminution de l'ADAMTS-5 lorsqu'il y a présence de GDF-5 dans le milieu de culture. De façon plus détaillée, il y a formation d'un plateau pour les doses de 100 ng/ml (74%) et de 250 ng/ml (76%). Pour la dernière dose, il y a une diminution beaucoup plus importante faisant ainsi passer le taux à 46% par rapport à l'échantillon non stimulé.

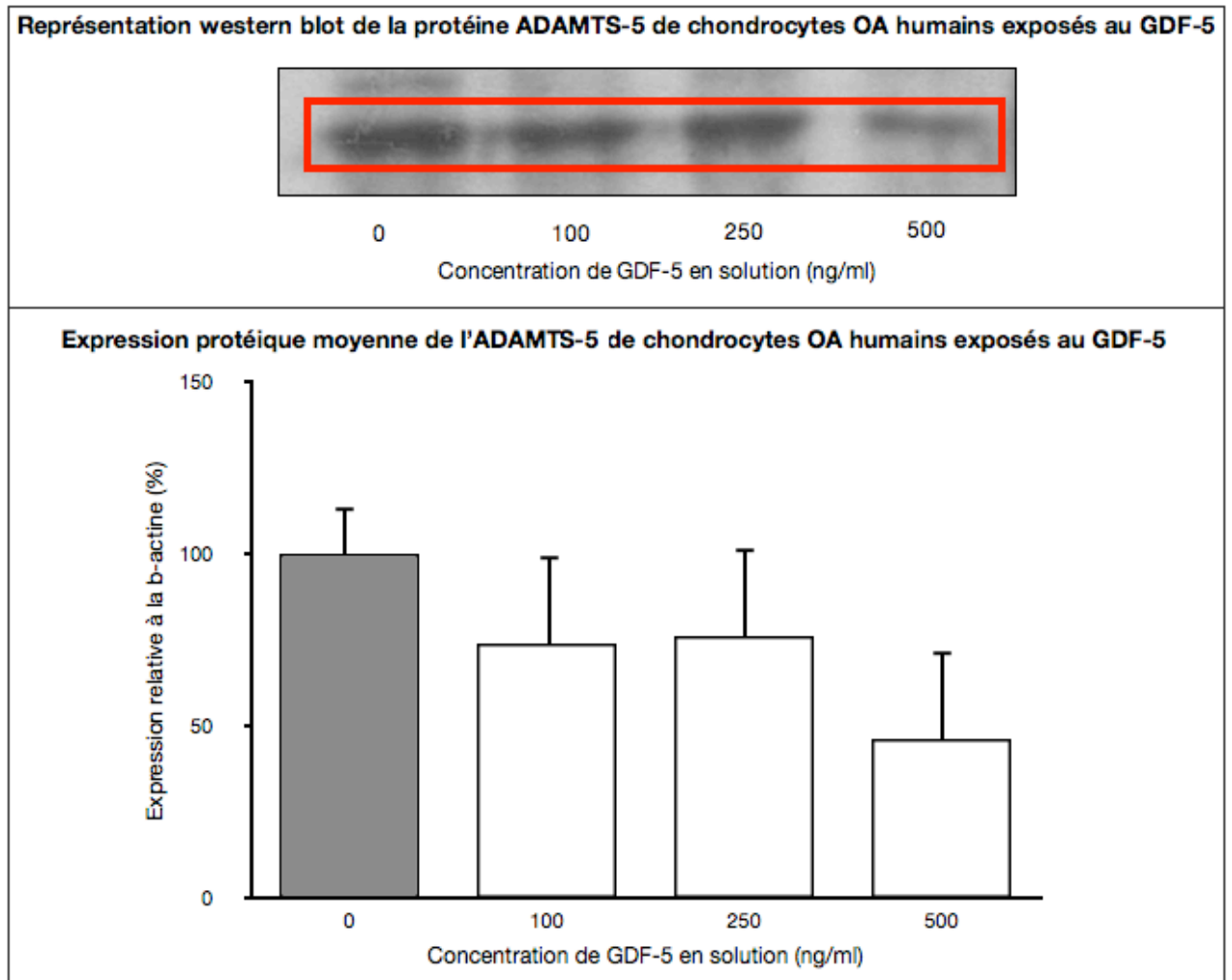


Figure 20: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de la protéine ADAMTS-5 après un Western Blot d'extraits cellulaires de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

Analyse de l'activité des aggrécanases

Après avoir analysé la cohérence entre l'expression des ARNm et la présence de la protéine au niveau cellulaire, des analyses ont été faites afin d'identifier l'activité globale des aggrécanases. Pour ce faire, le surnageant cellulaire a été récolté et dilué 1 :1 dans un tampon Laemmli. Ce nouveau mélange a été traité par Western blot et analysé comme les échantillons décrits précédemment. Seul l'anticorps primaire a été dirigé contre l'épitope N-Terminal de l'Aggrécan, qui se retrouve dans le surnageant suite à la digestion de la protéine par les aggrécanases. Sa présence est donc liée à l'activité des enzymes, ce que représentent les *Figure 21* et *Figure 22* suivantes.

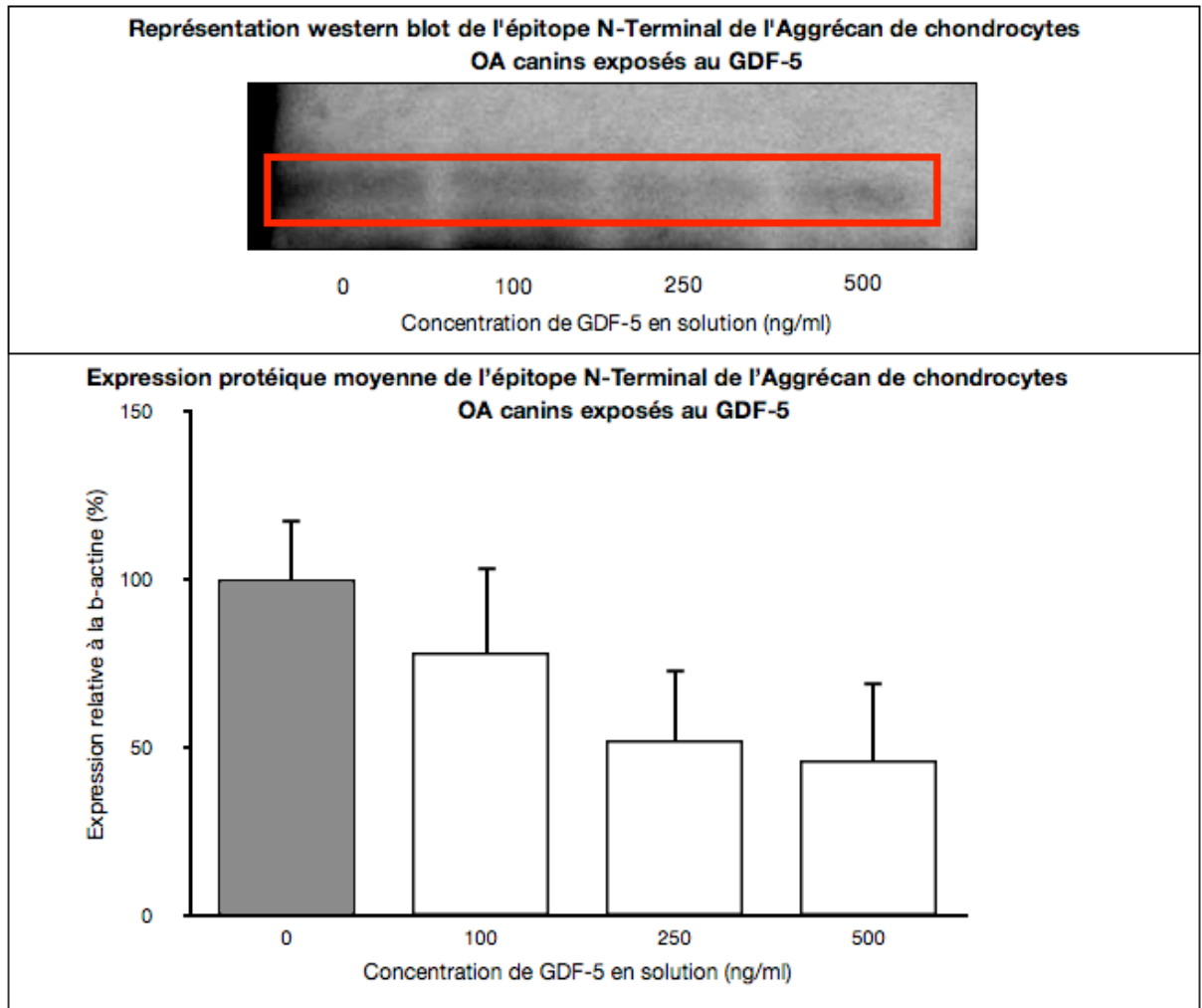


Figure 21: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de l'épitope N-Terminale de l'Aggrécan après un Western Blot d'extraits de surnageant de chondrocytes OA canins exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

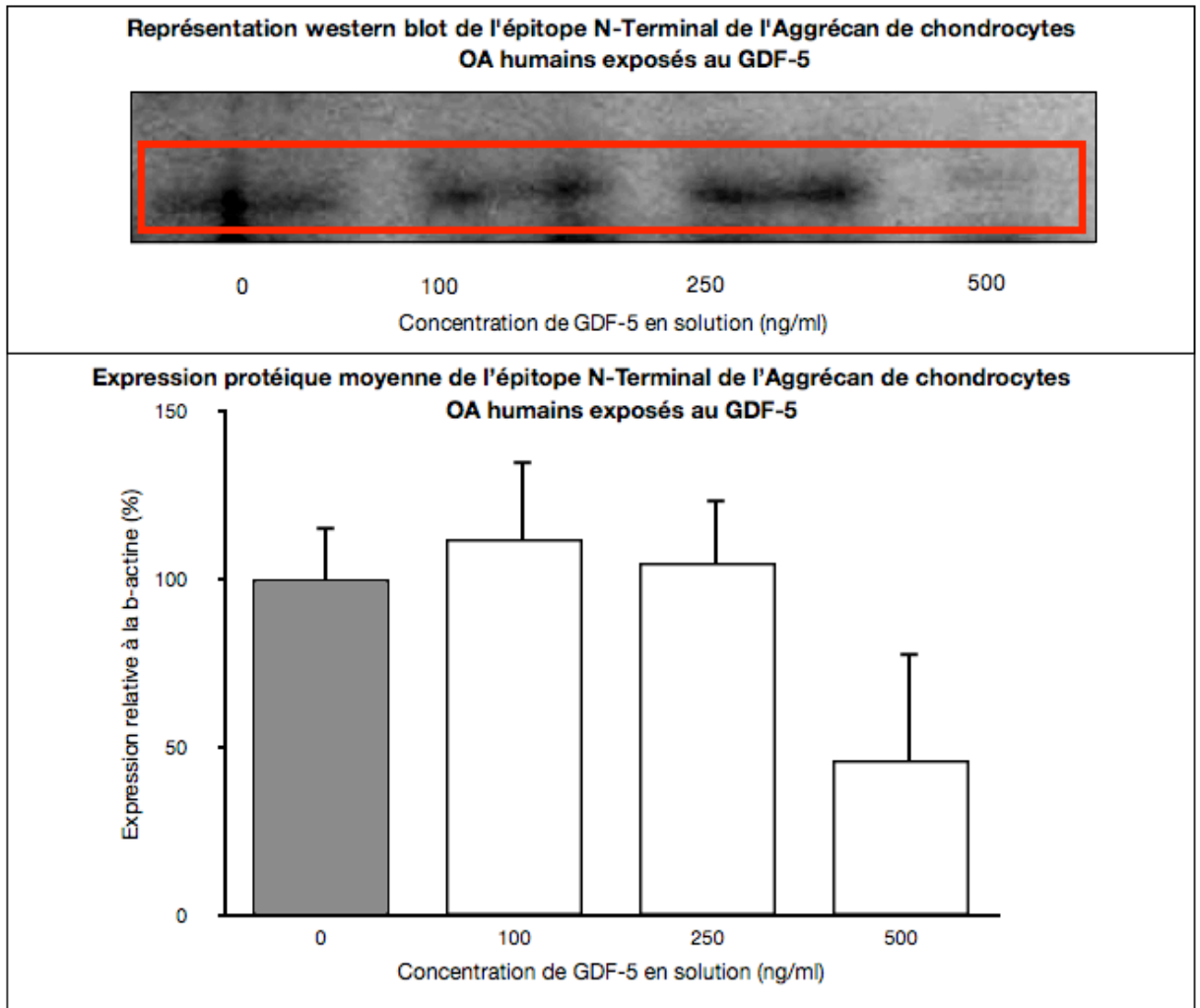


Figure 22: Représentation autoradiographique du western blot suivi des moyennes des intensités d'expression de l'épitope N-Terminal de l'Aggrécan après un Western Blot d'extraits de surnageant de chondrocytes OA humains exposés au GDF-5 en relation dose-dépendante pendant 72 heures. Les doses sont représentées en fonction de la concentration du produit dans le milieu de culture cellulaire et ont toutes été normalisées avec la protéine de la β -actine. La bande noire représente le contrôle alors que les bandes blanches représentent les conditions de stimulation. Les valeurs présentées ici représentent une moyenne des intensités afin d'obtenir un profil global d'expression.

Dans un premier temps, la *Figure 21* démontre que l'activité des enzymes tend à diminuer lorsqu'il y a du GDF-5 dans le milieu de culture des chondrocytes canins puisque l'expression/présence de l'épitope tend à diminuer. Cette diminution a aussi une tendance à être plus importante en fonction de la dose pour ces échantillons. De façon plus précise, l'activité semble diminuer de près de 78% pour la dose de 100 ng/ml pour continuer à diminuer à 52% pour la dose de 250 ng/ml et 46% pour 500 ng/ml. Finalement, la *Figure 22* présente un effet positif suivi d'un retour à la normale sur l'activité enzymatique dans les chondrocytes humains pour les doses de 100 (112%) et 250 (105%) ng/ml. Par contre, lorsque la dose atteint 500 ng/ml, il y a une baisse très importante à 46% de la présence de l'épitope et donc, de l'activité des aggrécases.

Résultats *in vivo* préliminaires

Dans ce dernier volet de l'étude, une étude pilote *in vivo* a été mise de l'avant afin d'évaluer l'impact potentiel du GDF-5 dans la pathologie de l'OA. Ainsi, il y a eu injection deux fois par semaine, une après 3 jours et l'autre après 4 jours, d'une quantité identifiée comme optimale de GDF-5 (300 ng/ml) dans l'articulation où il y a eu lacération du LCA. Le liquide synovial a été prélevé au stade de lacération de même qu'au temps du sacrifice, ce qui a permis d'y doser le fragment CTX-II du Col-II. Ce dosage est représenté à la *Figure 23* suivante.

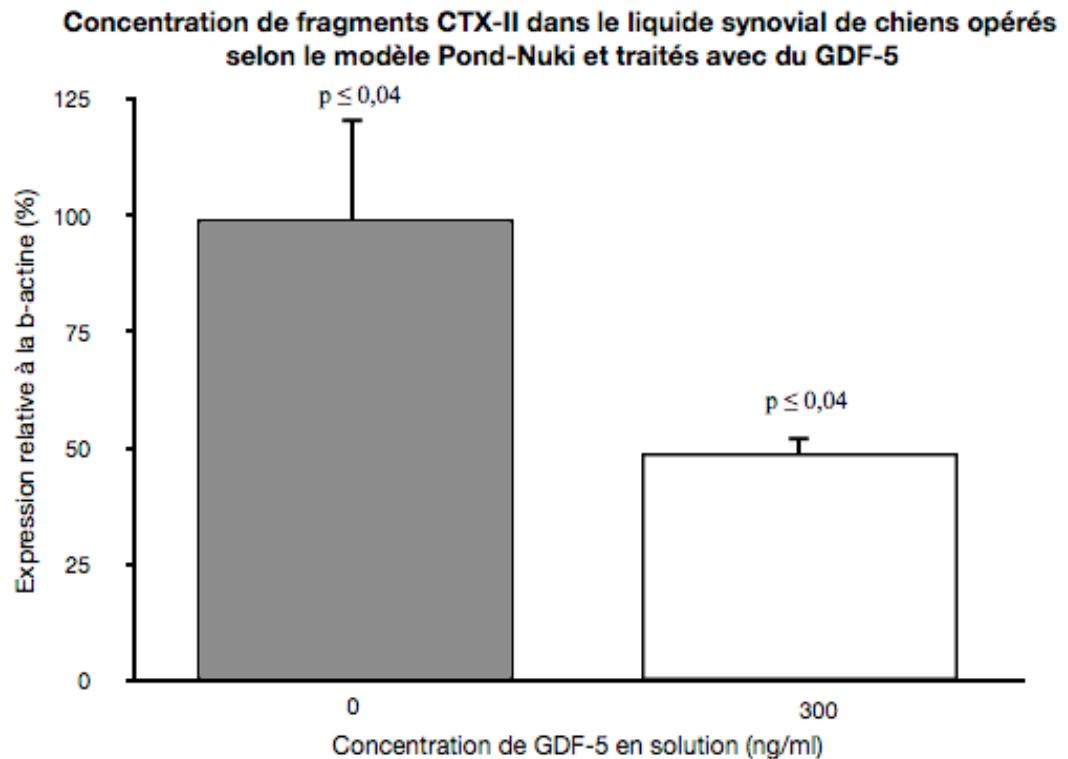


Figure 23: Concentration de fragment CTX-II dans le liquide synovial de chiens opérés selon le modèle Pond-Nuki avec injections intraarticulaires répétées de GDF-5. La bande noire représente le liquide synovial d'un chien contrôle avec rupture du LCA seule alors que la bande blanche représente la même condition avec injections intraarticulaires de GDF-5 tous les 3 jours. Le calcul statistique s'est fait à partir de $n=3$ spécimens pour chaque échantillon dosé en duplicata.

Cette figure présente la concentration du fragment CTX-II dans le liquide synovial de chiens ayant subi une lacération de leur LCA et dont certains ont reçus des injections régulières de GDF-5 de façon intra-articulaire. On peut ainsi observer que la condition LCA rompue seule a une concentration de 99 pg/ml de CTX-II alors que la condition LCA rompue avec GDF-5 (300 ng/ml) est à 49 pg/ml. Cette variation est significative à $p < 0.04$.

Chapitre 4. Discussion

Le but à long terme de cette étude étant de mesurer le potentiel thérapeutique du GDF-5 dans un contexte d'arthrose, ce mémoire traite donc de l'effet du GDF-5 sur l'équilibre anabolique des chondrocytes OA canins et humains. Pour ce faire, nous avons émis l'hypothèse que le GDF-5 devrait à la fois affecter les facteurs anaboliques et cataboliques du cartilage. Ainsi, le GDF-5 devrait avoir, chez les chondrocytes OA, à la fois la capacité de favoriser la production de facteurs anaboliques, principalement l'Aggrécan, et à la fois la capacité de diminuer l'expression de facteurs cataboliques, principalement celles des aggrécánases.

Tout d'abord, il est important de s'assurer que le modèle canin soit valable. Ce faisant, en se basant sur les critères de gradation de l'OA de Kellgren and Lawrence, tiré de Menkes 1991 (178), et sur nos observations macroscopiques, la *Figure 6* vient confirmer notre modèle. Elle y présente un phénotype d'OA de grade 3, ce qui le place entre les stades modéré et sévère. Cette caractérisation se confirme par la présence d'une lésion importante sur le plateau tibial interne : une lésion assez profonde pour exposer l'os sous-chondral. Par ailleurs, les spécimens humains sont gradés de 3 à 4 généralement associé à un phénotype chronique d'OA.

Par la suite, afin de bien confirmer les deux hypothèses de départ, il est important de s'assurer que les chondrocytes ne change pas de phénotype en présence de GDF-5. Actuellement, il a été démontré que le GDF-5 peut augmenter l'expression du Col-I, lié à un phénotype plus ostéogénique, et celle du Col-II, lié au phénotype chondrogénique, et qu'il peut favoriser l'activité ostéogénique à haute dose (179). Dans ce contexte, nous avons utilisé le ratio Col-II/Col-I afin de vérifier l'intégrité du phénotype ainsi que déterminer la dose qui favorisera au maximum l'activité chondrogénique. Ainsi, au niveau des chondrocytes canins, la *Figure 8* présente une augmentation du ratio et ce, pour toutes les doses. Cette augmentation est significative à $p < 0.001$ pour toutes les conditions avec des valeurs de 2,21 pour la dose de 100 ng/ml, 2,13 pour la dose de 250 ng/ml et 2,43 pour la dose de 500 ng/ml de GDF-5. Cela confirme que le Col-II est favorisé par rapport au Col-I avec un facteur moyen de 2 : 1 et qu'il y a maintien du phénotype. Or, dans les cas des chondrocytes humains, la *Figure 12* ne présente pas un effet similaire. De fait, le ratio a tendance à diminuer de façon non significative pour les doses de 100 ng/ml (0,96) et 250 ng/ml (0,86) et de façon significative à 0,62 pour la dose de 500 ng/ml ($p < 0.05$) de GDF-5. Cela démontre surtout que la synthèse du Col-I semble être favorisée lorsque la dose augmente, mais aussi que le Col-II ne varie pas de façon notable. Nous pouvons donc proposer la dose de 250 ng/ml comme étant la plus optimale chez l'homme puisqu'elle ne présente pas de débalancement phénotypique important. Cela concorde avec la littérature voulant que le produit favorise la différenciation et l'activité ostéogénique à hautes doses (180;181). Aussi, pour expliquer la différence entre les deux spécimens, nous pouvons d'abord mettre en évidence le stade de développement de l'OA. De fait, les différents

spécimens canins se situent à un stade plus léger et modéré dans le développement de l'OA, alors que les chondrocytes humains sont à un stade plus tardif et chronique (182). En effet, en vertu de notre protocole, les chondrocytes humaines prélevés sont à un stade de dégradation avancée où le seul traitement possible est la chirurgie. Nos spécimens canins sont, quant à eux, prélevés au début du stade chronique d'arthrose. Cette étape se caractérise, notamment selon Pelletier et al., 1983, comme étant le moment où les ulcérations débutent dans le modèle. Par ailleurs, le fait que nous avons utilisé un GDF-5 de provenance humaine peut aussi avoir un impact quant à la qualité de la réponse au niveau canin. En effet, de légères différences au niveau de la qualité du lien GDF-5/récepteur cellulaire peuvent influencer la réponse. Ainsi, une dose plus élevée chez l'animal pourrait être le reflet d'un effet d'une dose plus faible chez l'homme, mais il nous est impossible de le confirmer clairement dans cette étude. Par ailleurs, il faut tenir compte de la variabilité entre les spécimens d'une même espèce. Certaines variations apparaissent naturellement entre les candidats et influencent nos patrons d'expression. Or, en combinant tous les candidats d'une même espèce, nous tentons d'éliminer cette variabilité, en tentant d'atténuer les réponses extrêmes, et définir une réponse globale au GDF-5.

Nous avons ensuite évalué l'effet du GDF-5 sur un constituant majeur de la matrice cartilagineuse, l'Aggrécan. Pour ce faire, des chondrocytes OA provenant de spécimens canins et humains, ont été exposés à différentes doses (0, 100, 250 et 500 ng/mL) de GDF-5 pendant 72 heures. Conséquemment, la *Figure 7* démontre que l'expression de l'ARNm de l'Aggrécan de chondrocytes OA canins augmente en fonction de la dose. De fait,

l'expression relative au GAPDH augmente à 1,18 pour la dose de 100 ng/ml à 1,43 pour 250 ng/ml et finalement à 1,58 pour 500 ng/ml. Ces trois résultats sont significatifs à $p \leq 0,001$ lorsque comparées avec un contrôle non stimulé. Mais encore, du côté des chondrocytes OA humains, le profil d'expression de l'ARNm de l'Aggrécan présente un effet global similaire. En effet, la *Figure 11* présente une augmentation du facteur d'expression à 1,24 pour 100 ng/ml suivie de 1,68 pour 250 ng/ml et de 1,12 pour 500 ng/ml. Notons ici que seule la dose de 250 ng/ml est significative à $p \leq 0,02$, mais que les autres doses ont une tendance d'expression à la hausse lorsque comparées au contrôle. En somme, le GDF-5 a l'effet souhaité, c'est-à-dire qu'il augmente l'expression de l'Aggrécan dans les deux spécimens. Chez les spécimens canins, cette augmentation est proportionnelle à la dose alors que chez l'humain, on note une réponse maximale à 250 ng/ml. Cette dernière observation concorde aussi avec les résultats précédents portant sur le ratio Col-II/Col-I. De fait, les doses de 100 et 500 ng/ml présentent une réponse supérieure d'environ 20% au contrôle alors que le maximum de 250 ng/ml se retrouve avec une réponse de supérieure de 70%. Cette variation entre espèces pourrait, quant à elle, s'expliquer par une différence de sensibilité à la protéine, puisqu'elle est de nature humaine. Cela impliquerait, comme pour les résultats du ratio Col-II/Col-I, que les spécimens humains ont une sensibilité plus forte à la protéine utilisée, principalement au niveau du lien GDF-5/récepteur cellulaire. Une différence qui pourrait faire en sorte que le maximum d'expression soit à une dose inférieure. Les résultats appuient aussi cette théorie, notamment en constatant que le maximum d'expression chez le chien (1,58 à 500 ng/ml) est relativement près de celui humain (1,68 à 250 ng/ml).

Par ailleurs, nous avons tenté de vérifier si l'effet du GDF-5 se reflète au niveau protéique. Ainsi, au niveau des chondrocytes canins, l'expression de la protéine de l'Aggrécan (*Figure 15*) permet d'être corrélée avec l'expression de son ARNm, à savoir qu'il y a une réponse dose-dépendante. Cela se reflète par une expression protéique normalisée à la β -actine de 78% pour les doses de GDF-5 de 100 ng/ml, 108% pour la dose de 250 ng/ml et 132% pour la dose de 500 ng/ml. Au niveau des chondrocytes humains (à la *Figure 18*), on note une baisse d'environ 20% de l'expression (81%) pour la dose de 100 ng/ml. La dose de 250 ng/ml reflète les résultats de l'expression de l'ARNm; expression la plus forte avec 117%. La dose de 500 ng/ml se caractérise par une baisse d'expression à (108%). Pour les deux spécimens, le profil d'expression, ou l'allure des bandes de résultats, de l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'Aggrécan sont similaires. Cela confirme la littérature voulant que le GDF-5 augmente la synthèse de l'Aggrécan des chondrocytes (183). Le fait que les proportions entre l'expression des ARNm et des protéines ne soient pas identiques peut s'expliquer par la régulation post-transcriptionnelle. Ce faisant, ce n'est pas tous les ARNm qui sont traduits et qui deviennent des protéines, mais le patron d'expression reste toutefois similaire. Lorsque comparée au contrôle, on note que la dose de 100 ng/ml provoque une diminution de la protéine, mais que les deux autres doses stimulent sa synthèse de façon croissante selon la dose. La baisse observée pour la dose de 100 ng/ml pourrait, quant à elle, s'expliquer par une variabilité et une sensibilité importante dans la méthode et chez le spécimen. De fait, de légères variations entre la taille de bandes, de temps d'exposition ou autres ont pu influencer les valeurs et ainsi provoquer une

diminution. La sensibilité a, quant à elle, aussi pu jouer un impacte, à cause de la différence d'espèces qui peut modifier l'affinité récepteur-ligand.

En somme, la production de l'ARNm de l'Aggrécan, tant chez les chondrocytes humains que canins, augmente lorsqu'il y a du GDF-5 dans le milieu. Bien que certaines conditions présentent des variations, il y a essentiellement une réponse dose-dépendante favorisant la production de l'Aggrécan. Qui plus est, cette conclusion se reflète aussi au niveau de la synthèse de la protéine. Bien que la dose de 100 ng/ml provoque une baisse de la présence de la protéine, les autres doses ont démontré une augmentation de la protéine. Avec une réponse maximale à 250 ng/ml pour l'humain et 500 ng/ml chez le chien, le GDF-5 stimule la production de l'Aggrécan chez les chondrocytes OA. En comparant avec la littérature, la confirmation de la première partie de notre hypothèse vient aussi confirmer les études précédentes qui stipulaient que le GDF-5 augmentait la production de l'Aggrécan (183). Qui plus est, le fait que le Col-I semble être favorisé à 500 ng/ml, au niveau des collagènes, vient aussi confirmer la littérature qui présente le GDF-5 comme stimulant de l'activité ostéogénique. En effet, il semble qu'il peut induire une différenciation cellulaire vers le tissu osseux lorsque la dose augmente (180;181). Cela confirme la place du GDF-5 comme molécule favorisant la production de facteurs anaboliques chez les chondrocytes.

La deuxième partie de cette étude porte sur le contrôle du GDF-5 sur les enzymes responsables de la dégradation du cartilage. Pour le mesurer, nous avons choisi d'étudier le profil d'expression des aggrecanases ADAMTS-4 et ADAMTS-5 chez les chondrocytes OA. Ces enzymes ont été choisies puisqu'elles sont reconnues comme étant les principales aggrecanases responsables de la dégradation de l'Aggrecan dans le contexte OA et qu'elles sont principalement associées au développement de la pathologie. (107) Dans un premier temps, en observant l'expression des ARNm des chondrocytes OA canins, il est possible de constater que le GDF-5 diminue l'expression de ces deux enzymes. De fait, selon les résultats de la *Figure 9*, le GDF-5 permet une diminution de l'ARNm de l'ADAMTS-4 pour les trois doses utilisées. De façon plus précise, cela implique une diminution non significative à 0,67 pour les doses de GDF-5 de 100 ng/ml, suivie d'une baisse à 0,38 ($p \leq 0,03$) pour celle de 250 ng/ml et d'une augmentation à 0,42 ($p \leq 0,02$) pour celle de 500 ng/ml. Qui plus est, la *Figure 10* présente des baisses significatives de l'expression de l'ARNm de l'ADAMTS-5 pour l'ensemble des doses de GDF-5. Cela signifie une diminution à 0,48 ($p \leq 0,02$) de l'expression relative au GAPDH pour la dose de 100 ng/ml, alors que la dose de 250 ng/ml est à 0,37 ($p \leq 0,01$) et celle de 500 ng/ml à 0,44 ($p \leq 0,01$). Dans un deuxième temps, les chondrocytes OA humains présentent un patron d'expression des ADAMTS légèrement différent en réponse au GDF-5. Pour les ARNm de l'ADAMTS-4, on note une diminution de l'expression relative au GAPDH. Cela est démontré à la *Figure 13* avec des valeurs de 0,63 ($p < 0,02$) pour la dose de 100 ng/ml, 0,58 ($p < 0,01$) pour la dose de 250 ng/ml et 0,69 ($p < 0,02$) pour la dose de 500 ng/ml. Il est alors possible d'affirmer que le GDF-5 diminue l'expression de l'ADAMTS-4 puisque toutes les doses

ont une expression inférieure au contrôle. Cependant, cet effet est maximum à basse concentration de GDF-5, sans effet relatif à la dose. Au niveau de l'ADAMTS-5, on note une diminution d'expressions semblables, mais non significatives. Selon la *Figure 14*, les valeurs de 0,70 pour la dose de 100 ng/ml, 0,73 pour la dose de 250 ng/ml et 0,58 ($p \leq 0,02$) pour la dose de 500 ng/ml montrent que l'expression diminue dès qu'il y a du GDF-5 en culture. Cet effet est stable puisqu'il n'y a pas de différences majeures entre les doses de 100 et 250 ng/ml. Cela implique aussi qu'une quantité plus importante de GDF-5 doit être présente en solution pour renverser l'augmentation physiologique d'autres molécules pro-ADAMTS-5 dans un contexte d'OA. De fait, des études ont démontré que plusieurs médiateurs inflammatoires ont tendance à être produits par les chondrocytes dans l'OA (184). Aussi, puisque les chondrocytes humains sont à un stade OA plus avancé, ils produisent plus de médiateurs inflammatoires, ce qui concorde avec nos résultats. L'effet du GDF-5 est tout de même bénéfique puisque toutes les doses diminuent l'expression des aggrecanases et confirment donc la seconde hypothèse. Ainsi, tant au niveau humain que canin, le GDF-5 tend à diminuer l'expression des ARNm des aggrecanases ADAMTS-4 et ADAMTS-5.

Par la suite, une analyse de l'expression des protéines ADAMTS-4 et ADAMTS-5 a été faite par western blot où les expressions ont été normalisées avec l'expression de la β -actine. Ainsi, la *Figure 16* présente des profils non significatifs à 83% de l'expression pour la dose de 100 ng/ml suivie d'une remontée à 94% pour la dose de 250 ng/ml pour se terminer avec une remontée à 122% pour la dose de 500 ng/ml de GDF-5. Ainsi, on note un

effet bénéfique global pour les doses de 100 et 250 ng/ml puisqu'elles semblent diminuer l'expression de l'ADAMTS-4, mais cet effet tend à diminuer lorsque la dose augmente. Dans le cas de l'ADAMTS-5, par contre, la *Figure 17* présente une augmentation non significative de la protéine pour l'ensemble des doses. Cette augmentation a, cependant, une allure de plateau pour l'ensemble des doses, c'est-à-dire que les valeurs de 118% pour la dose de 100 ng/ml, 114 % pour la dose de 250 ng/ml et 116% pour la dose de 500 ng/ml sont toutes proches l'une de l'autre. Cela implique que le GDF-5 n'a pas d'effet sur la production de la protéine de l'ADAMTS-5. De fait, il a été décrit que l'ADAMTS-5 était exprimée de façon constitutive dans les chondrocytes OA et qu'elle était très peu influencée par les médiateurs inflammatoires ou autres (110;111). Ce faisant, il est normal d'avoir une réponse stable qui ne varie pas beaucoup pour l'ensemble des doses. Il se pourrait, cependant, qu'il existe un phénomène compensatoire, c'est-à-dire une diminution de la dégradation de la protéine, pour annuler la baisse de l'ARNm expliquée plus tôt chez ces spécimens. Cela expliquerait l'expression supérieure au contrôle. Par ailleurs, pour les chondrocytes OA humains, on note que le profil d'expression de l'ADAMTS-4 est diminué lorsque le GDF-5 est présent en culture. Selon la *Figure 19*, l'ensemble des doses présente une valeur inférieure lorsque comparée à la condition contrôle. Plus spécifiquement, des tendances d'expressions avec des valeurs moyennes de 68% à 100 ng/ml, 76% à 250 ng/ml et 83% à 500 ng/ml démontrent que l'effet semble être bénéfique pour toutes les doses, mais que le produit perd de son efficacité lorsque la dose augmente. Quant à l'ADAMTS-5, on note que le GDF-5 produit un effet similaire, c'est-à-dire que l'ensemble des doses a une expression inférieure au contrôle. De fait, selon les résultats non significatifs présentés à la

Figure 20, les doses de 100 ng/ml (74%) et 250 ng/ml (76%) sont similaires suivi d'une chute à 46% pour la dose de 500 ng/ml. Ainsi, pour ce spécimen, on note une certaine corrélation entre l'allure des bandes de l'expression des ARNm et des protéines pour les deux aggrécanases. Bien que ce ne soient que des tendances d'expressions, on retrouve les mêmes diminutions/augmentations au niveau des différentes aggrécanases et des différentes doses, ce qui confirmerait l'effet bénéfique du GDF-5. Or, puisque les résultats ne sont pas significatifs, il serait intéressant d'approfondir ce volet avec d'autres études afin d'affirmer ou infirmer ces observations.

Toujours dans cette optique, il faut s'attarder à l'activité des aggrécanases afin de bien confirmer la seconde hypothèse. En se basant sur les résultats des *Figure 21* et *Figure 22*, il est possible d'observer la présence de l'épitope de l'Aggrécan dans les milieux de culture des chondrocytes. Ainsi, lorsqu'il y a variations de la présence de ce fragment, il est possible d'y corréler positivement l'activité des aggrécanases. Pour ce qui est des chondrocytes canins, la *Figure 21* présente une diminution dose-dépendante de l'épitope et donc, de l'activité enzymatique. De fait, les tendances d'expression, non significatives cependant, semblent diminuer à 78% pour la dose de 100 ng/ml, 52% pour la dose de 250 ng/ml et 46% pour 500 ng/ml. Quant aux chondrocytes humains OA, on note un profil d'expression similaire; l'activité des enzymes diminue avec la dose. Cependant, les valeurs pour les différentes doses ont un profil différent des chondrocytes OA canins. Bien que les résultats ne soient pas significatifs, les doses de 100 ng/ml (112%) et de 250 ng/ml (105%) ont des valeurs supérieures, mais très près de la condition contrôle. Cela pourrait s'expliquer

par le fait que l'enzyme reste en solution pendant un fort laps de temps sans être active ou que la présence d'autres facteurs pro aggrécanases, comme des molécules pro inflammatoires,(184) soit trop importante pour que notre produit ait un effet. Par contre, la dose de 500 ng/ml offre une valeur moyenne d'expression similaire à l'expression canine avec une valeur de 46%. Bien que cette condition soit associée à un changement dans le phénotype cellulaire, il est quand même possible de constater une tendance à la diminution. Par ailleurs, le cas des chondrocytes canins est particulier puisque l'expression protéique de l'ADAMTS-5 chez cette espèce porte à croire qu'il y a une plus grande présence de l'épitope, ce qui n'est pas le cas ici. Cela implique que l'épitope n-terminal de l'Aggrécan (NITEGE) dans le surnageant est davantage corrélé avec l'ADAMTS-4, puisque les valeurs correspondent davantage avec l'expression protéique de celle-ci. Cela est aussi en accord avec la théorie voulant que l'ADAMTS-5 soit exprimée de façon plus constitutive alors que l'ADAMTS-4 est inductible (110;111). Elle agirait alors de façon plus spécifique et efficace sur la dégradation de l'Aggrécan.

En résumé, les résultats démontrent qu'il y a une baisse de l'expression des aggrécanases ADAMTS-4 et ADAMTS-5 lorsqu'il y a du GDF-5 en solution. Or, cet effet n'est pas en fonction de la dose, ce qui laisse présager que le GDF-5 agit via une autre protéine avec une activité saturable et que son effet se produit surtout à faible dose. Qui plus est, seule la protéine ADAMTS-5 canine ne semble pas affectée par ce phénomène. Cela ouvre donc une piste quant à l'identification de la voie de signalisation du GDF-5, c'est-à-dire la voie qui induit l'ADAMTS-4. Ainsi, puisqu'il y a une baisse de l'ARNm, de

l'expression protéique et de l'activité de nos deux enzymes, la seconde hypothèse s'avère confirmée.

Dans un autre ordre d'idée, une étude in vivo préliminaire a été effectuée au niveau canin. Suite à des injections intra-articulaires de GDF-5 (300 ng/mL) dans un modèle canin Pond-Nuki, il a été possible d'y doser les fragments CTX-II, ou épitope du Col-II, dans le liquide synovial des genoux. Ainsi, la *Figure 23* présente des valeurs de 99 pg/ml pour la condition contrôle, c'est-à-dire une rupture simple du LCA, et 49 pg/ml ($P < 0.04$) pour les genoux traités au GDF-5. Cette différence significative propose que le GDF-5 prévienne l'apparition de l'OA. Cela vient confirmer, dans le modèle in vivo, l'ensemble des résultats démontrés lors des essais in vitro décrits précédemment. De fait, la diminution de l'épitope propose que le Col-II soit moins dégradé en présence de GDF-5, confirmant son potentiel protecteur. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la molécule favorise la production de l'Aggrécan et diminue la production des aggrécanases, molécules associées au stade précoce du développement de l'OA. Ainsi, un effet protecteur à cette étape permettrait de retarder l'étape chronique de la dégradation du collagène. De plus, il faut noter que la dose de 300 ng/mL utilisée dans cette étude s'avère efficace et reflète les résultats maximaux obtenus dans les études in vitro. L'effet direct du GDF-5 sur les chondrocytes se reflète donc directement dans son modèle animal par une protection du cartilage face au développement de l'OA.

De plus, maintenant que notre hypothèse de départ a été confirmée, il est intéressant de s'attarder au mécanisme d'action du GDF-5 et d'en faire une comparaison avec la littérature actuelle. Au niveau des GAG, deux études par Isnard et Ohno, (185;186) mettent en évidence l'importance de leurs fragments pour l'activation de certaines MMPs, notamment les MMP-2 et MMP-9. Puisque le GDF-5 diminue l'importance des aggrecanases de leur activité, et possiblement la quantité de fragments de GAG, il est intéressant de comparer des séquences temporelles de l'activation de ces MMPs lorsqu'il y a du GDF-5 en quantité suffisante en solution. Il faudrait donc pousser l'étude au niveau des MMP 2 et 9 afin de confirmer un éventuel ralentissement de l'apparition de la pathologie. Par contre, des résultats préliminaires, non présentés ici, n'ont pas permis de démontrer un effet du GDF-5 sur la MMP-13 au niveau des ARNm. Cependant, d'autres études ont démontré que les molécules inhibitrices telles que la TIMP-3 bloquaient l'activité de la MMP-13 plutôt que son expression (187). Puisque le GDF-5 fait parti de la superfamille des TGF- β et qu'il a été prouvé que le TGF- β 1 a la capacité de stimuler la molécule TIMP-3 via la voie de signalisation akt (188), il est intéressant de s'attarder à cette voie et à l'activité de la MMP-13 afin d'y vérifier l'effet du GDF-5. Du côté des aggrecanases, TIMP-3 a aussi été identifiée comme inhibitrice de l'ADAMTS-4 (189). Cela concorde avec nos résultats voulant que notre produit diminue l'activité de cette enzyme. Comme il a été observé dans l'analyse de la seconde hypothèse, cette diminution serait due à une autre protéine activée par le GDF-5. Aussi, puisque le GDF-5 augmente l'Aggrécan et diminue les ADAMTS, il pourrait s'avérer un traitement préventif de l'OA. De fait, puisqu'il semble avoir le potentiel de renverser l'équilibre de dégradation de l'Aggrécan, il

pourrait agir dans le stade précoce de l'OA, où l'on retrouve cette dégradation (78;83;85). Ainsi, lorsqu'utilisé à la suite de traumatismes, par exemple, il pourrait retarder le développement de l'arthrose jusqu'à l'étape de chirurgie qui permettra de rétablir la cinématique de l'articulation. Qui plus est, cette option s'avère intéressante puisqu'il a été démontré que le GDF-5 a la capacité d'aider à la réparation des ligaments (190). Aussi, comparativement aux autres médicaments modifiant la maladie, le GDF-5 a le potentiel de renverser un équilibre plutôt que de diminuer l'implication d'un facteur, comme l'ajout d'IL-1Ra par exemple (141-143). Cependant, cette approche limitée devrait être administrée avant les premiers signes radiologiques de l'OA puisqu'elle n'aura qu'un faible impact lorsqu'ajouté à ce stade. De fait, les autres médicaments agissent sur des voies de signalisation qui sont présentes dans le stade tardif de l'arthrose alors que le GDF-5 agit sur le métabolisme de l'Aggrécane, qui n'est plus présent à ce stade (78;86;87). Les résultats des chondrocytes canins appuient aussi cette théorie. De fait, bien qu'ils se situent dans un stade encore modéré de développement de l'OA, ils ont généralement une meilleure réponse au GDF-5 que les chondrocytes humains. Comme il a été démontré précédemment, on leur attribue une meilleure augmentation du taux d'Aggrécane et de diminution de l'expression et de l'activité des aggrécánases ADAMTS-4 et ADAMTS-5.

Conclusion et perspectives futures

En conclusion, l'hypothèse de départ a été confirmée par notre étude. De fait, nos résultats ont confirmés la littérature voulant que le GDF-5 augmente l'activité anabolique des chondrocytes, principalement l'Aggrécan. De plus, les résultats ont aussi été en mesure de prouver une diminution de l'expression et de l'activité des aggrécanases, responsables de la dégradation de l'Aggrécan. Cela implique que notre molécule agit à la fois de façon positive sur le métabolisme anabolique et sur le métabolisme catabolique des chondrocytes. Nous avons aussi mis en évidence une dose maximale de 250 ng/ml pour cet effet combiné. Ainsi, nous croyons que le GDF-5 agit principalement sur l'activité anabolique et diminue l'activité catabolique via l'activation d'une autre protéine, non identifiée. Finalement, ces résultats ont été obtenus sans qu'il y ait eu un changement de phénotype au niveau des chondrocytes, ce qui montre l'implication potentielle que pourrait avoir le GDF-5 dans le traitement de l'OA. Qui plus est, il semble avoir le potentiel de renverser la cascade de dégradation présente dans les premières étapes de l'OA. Enfin, le produit pourrait permettre de ralentir la première dégradation de la matrice de protéoglycan, souvent associée à l'étape précoce de l'OA. Il pourrait donc être une solution importante à la prévention de la pathologie suite à des traumatismes importants sur les articulations, souvent causes de l'OA. Comme futures cibles, il serait intéressant d'explorer davantage le volet in vivo de l'étude. En analysant le cartilage de ces chiens traités, il nous serait alors possible d'identifier la cause de l'augmentation du CTX-II et d'approfondir l'impact à long terme du GDF-5 sur le cartilage. Il serait aussi intéressant de s'attarder à la signalisation intracellulaire du GDF-5.

Mettre en évidence les protéines impliquées permettrait d'éclaircir ses différentes cibles, de même qu'il permettrait de comprendre comment il augmente les facteurs anaboliques et diminue les facteurs cataboliques. Cette voie de signalisation pourrait alors s'avérer une cible de choix pour d'éventuelles cibles pharmaceutiques et traitements de l'OA.

Bibliographie

- (1) Chapman K TAMIWCR-LJER. 1A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Human Molecular Genetics* 2008;17(10):-1497.
- (2) Chang S.C, Hoang B, Thomas J.T., Vukicevic S, Luyten F.P., Ryba N.J., et al. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J.Biol.Chem* [269], 28227-28234. 1994.
- (3) Storm E.E, Huynh T.V, Copeland N.G, Jenkins N.A, Kingsley D.M, Lee S.J. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* [368], 639-643. 1994.
- (4) Katayama R. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology* 2004;43(8):980-5.
- (5) Simank HG, Sergi C, JungM. Effects of local application of growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in a fullthickness cartilage defect model. *Growth Factors* [22], 35-43. 2004.
- (6) Onyekwelu IGMHC. Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *Journal of cellular biochemistry* 2009;107(3):383-92.
- (7) Venn MF. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. *Annals of the Rheumatic Diseases* [38], 57-62. 1979.
- (8) Clouet JVCMCPMMYWPGGGJ. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug discovery today* 2009;14(19-20):913-25.

- (9) Stockwell RA. Morphology of cartilage. In: Maroudas A & Keuttner K (eds.), editor. *Methods in cartilage research*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 61-3.
- (10) Takahashi M, Kushida K, Ohishi T. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis and rheumatism* [37], 724-728. 1994.
- (11) Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research & Therapy* [7], 160-169. 2005.
- (12) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation* [97], 2011-2019. 1996.
- (13) Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* [2], 322-329. 2002.
- (14) Heinegrd D. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *International journal of experimental pathology* 2009;90(6):575-86.
- (15) Huang K, Wu LD. Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: a Review. *The Journal of International Medical Research* 36[6], 1149-1160. 2008.
- (16) Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, et al. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Exp Rheumatol* [26], 139-145. 2008.
- (17) Caterson B, Flannery CR, Hughes CE. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* [19], 333-344. 2000.

- (18) Roughley PJ, White RJ. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry* [255], 217-224. 1980.

- (19) Dudhia J, Davidson CM, Wells TM. Studies on the G3 domain of aggrecan from human cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. [785], 245-247. 1996.
Ref Type: Journal (Full)

- (20) Roughley PJ, Mort JS. Ageing and the aggregating proteoglycans of human articular cartilage. *ClinicalScience (London, England)* [71], 337-344. 1986.

- (21) Moldovan Florina. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis and rheumatism* 1997;40:1653-61.

- (22) Lum ZP. Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *Journal of Cellular Physiology* 1996;13:426-38.

- (23) Moulharat N.. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;12:296-305.

- (24) Fukui N ZYMea. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2003;85-A (Suppl. 3):59-66.

- (25) Nakase Takanobe. Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:278-84.

- (26) Middleton JF & Tyler JA. Upregulation of insulin-like growth factor-1 gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1992;51:440-7.

- (27) Mi Z. Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints. *Arthritis and rheumatism* 2000;43:2563-70.
- (28) Martel-Pelletier J., Boileau C., Pelletier J.P., Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2008;22(2):351-84.
- (29) Glasson SS. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434:644-8.
- (30) Stanton Heather. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005;434:648-52.
- (31) Fernandes JC. collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in early experimental osteoarthritic canine cartilage. An immunohistochemical study. *The Journal of Rheumatology* 1998;25:1585-94.
- (32) Langdon Carry. Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *The American Journal of Pathology* 2000;157:1187-96.
- (33) Plater-Zyberk C. Amelioration of arthritis in two murine models using antibodies to oncostatin M. *Arthritis and rheumatism* 2001;44:2697-702.
- (34) Herndon James. H. Recent socioeconomic trends in orthopaedic practice. *J Bone Joint Surg Am* 2001;A(83).
- (35) Peyron J.G. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: State-of-the art review. 1993.
- (36) Robinson IC. Control of growth hormone (GH) release by GH secretagogues. *Novartis Foundation symposium* 2000;227:206-20.
- (37) Todd Allen R, Robertson C.M, Harwood F.L. Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: Analysis of cell density, apoptosis-related gene expression

and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* [12], 917-923. 2004.

- (38) Robertson C.M., Pennock A.T., Harwood F.L. Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* [14], 471-476. 2006.
- (39) Felson D.T., Couropmitree N.N., Chaisson C.E. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* [41], 1064-1071. 1998.
- (40) Newman B., Wallis G.A. Is osteoarthritis a genetic disease? *Clin Invest Med* [25], 139-149. 2002.
- (41) Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* [13], 111-116. 2001.
- (42) MacGregor A.J, Antoniadou L., Matson M. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: Results of a classic twin study. *Arthritis Rheum* [43], 2410-2416. 2000.
- (43) Hirsch R., Lethbridge-Cejku M., Hanson R. Familial aggregation of osteoarthritis: Data from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Arthritis Rheum* [41], 1227-1232. 1998.
- (44) Knowlton R.G, Katzenstein P.L, Moskowitz R.W. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *N Engl J Med* [322], 526-530. 1990.

- (45) Ala-Kokko L., Baldwin C.T., Moskowitz R.W. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [87], 6565-6568. 1990.
- (46) Valdes A. The contribution of genes to osteoarthritis. *Medical clinics of North America* 2009;93(1):45-66, x.
- (47) Valdes AM. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis and rheumatism* 2006;54(2):533-9.
- (48) Valdes AM. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(8):2497-507.
- (49) Hunter DJ. A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(8):2489-96.
- (50) Kizawa H. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics* 2005;37(2):138-44.
- (51) Kaliakatsos M. Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006;14(6):609-11.
- (52) Valdes AM. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis and rheumatism* 2007;56(1):137-46.
- (53) Ikeda T. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in cartilage-specific collagen genes with knee and hip osteoarthritis in the Japanese population. *Journal of bone and mineral research* 2002;17(7):1290-6.
- (54) Valdes AM. Radiographic progression of lumbar spine disc degeneration is influenced by variation at inflammatory genes: a candidate SNP association study in the Chingford cohort. *Spine* 2005;30(21):2445-51.
- (55) Miyamoto Y. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics* 2007;39(4):529-33.

- (56) Southam L. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Human Molecular Genetics* 2007;16(18):2226-32.
- (57) Rovetta G. HLA-DRB1 alleles and osteoarthritis in a group of patients living in Liguria-Italy. *Minerva medica* 2006;97(3):271-5.
- (58) Riyazi N. HLA class II is associated with distal interphalangeal osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003;62(3):227-30.
- (59) Moos V. Association of HLA-DRB1*02 with osteoarthritis in a cohort of 106 patients. *Rheumatology* 2002;41(6):666-9.
- (60) Pola EP. Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005;13(11):1025-8.
- (61) Fytili P. Interleukin-10G and interleukin-10R microsatellite polymorphisms and osteoarthritis of the knee. *Clinical and experimental rheumatology* 2005;23(5):621-7.
- (62) Kerin A. Molecular basis of osteoarthritis: Biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci* 2002;(59).
- (63) Cole A.A. Molecular basis for differences between human joints. *Cell Mol Life Sci* 2002;(59).
- (64) Huch K. Osteoarthritis in ankle and knee joints. *Semin Arthritis Rheum* 1997;(26).
- (65) Jadelis K., Miller M.E., Ettinger W.H. Strength, balance, and the modifying effects of obesity and knee pain: Results from the Observational Arthritis Study in Seniors (oasis). *J Am Geriatr Soc* [93], 271-273. 2001.
- (66) Forman M.D., Kaplan D.A., Muller G.F. The epidemiology of osteoarthritis of the knee. In: Peyron J.G., editor. *Epidemiology of Osteoarthritis*. Paris: Ciba-Geigy; 1980.

- (67) Leach R.E., Baumgard S., Broom J. Obesity: Its relationship to osteoarthritis of the knee. Clin Orthop [93], 271-273. 1973.
- (68) Magliano M. Obesity and arthritis. Menopause International 2008;14(4):149-54.
- (69) Linn F.C, Radin E.L. Lubrication of animal joints, 3: The effect of certain chemical alterations of the cartilage and lubricant. Arthritis Rheum [11], 674-682. 1968.
- (70) Borrelli J. Jr. Diminished cartilage creep properties and increased trabecular bone density following a single, sub-fracture impact of the rabbit femoral condyle. Journal of Orthopaedic Research 2010.
- (71) Thelin N., Holmberg S., Thelin A. Knee injuries account for the sports-related increased risk of knee osteoarthritis. Scand J Med Sci Sports [16], 329-333. 2006.
- (72) Bullough P.G. The geometry of diarthrodial joints, its physiologic maintenance, and the possible significance of age-related changes in geometry-to-load distribution and the development of osteoarthritis. Clin Orthop [156], 61-66. 1981.
- (73) Day W.H., Swanson S.A., Freeman M.A. Contact pressures in the loaded human cadaver hip. J Bone Joint Surg Br [59B], 272-278. 1975.
- (74) Sokoloff L. The Biology of Degenerative Joint Disease. Chicago: University of Chicago Press; 1969.
- (75) Trueta J. Studies of the Development and Decay of the Human Frame. Philadelphia: WB Saunders; 1968.
- (76) Swanson S.A.V. The mechanics of synovial joints. In: Simpson D.C., editor. Modern Trends in Biomechanics vol.1. London: Butterworths; 1970. p. 239.

- (77) Gilbertson E.M. Development of periarticular osteophytes in experimentally induced osteoarthritis in the dog: A study using microradiographic, microangiographic, and fluorescent bone-labelling techniques. *Ann Rheum Dis* 1975;34:12-25.
- (78) Mankin H.J., Brandt K.D. Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. In: Moskowitz R.W., Howell D.S., Goldberg V.M, editors. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 2nd ed. Philadelphia: 1992. p. 109-54.
- (79) Malesud C.J., Goldberg V.M, Moskowitz R.W. Biosynthesis of proteoglycan in vitro by cartilage from human osteochondrophytic spurs. *Biochem J* [206], 329-341. 1982.
- (80) Bakker A.C., van de Loo F.A, van Beuningen H.M. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: Evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;(9):128-36.
- (81) Uchino M., Izumi T., Tominaga T. Growth factor expression in the osteophytes of the human femoral head in osteoarthritis. *Clin Orthop* 2000;(377):119-25.
- (82) Danielsson L.G. Incidence and prognosis of coxarthrosis. *Clin Orthop* 1993;(287):13-8.
- (83) Maroudas A.I. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* [260], 808-809. 1976.
- (84) Muir H. Current and future trends in articular cartilage research and osteoarthritis. In: Kuettner K.E, Schleyerbach R., Hascall V.C., editors. *Articular Cartilage and Biochemistry*. New York: Raven Press; 1986. p. 423-40.
- (85) Herbage D, Huc A., Chabrand D. Physicochemical study of articular cartilage from healthy and osteoarthritic human hips: Orientation and thermal stability of collagen fibres. *Biochim Biophys Acta* [271], 339-346. 1972.

- (86) Mankin H.J., Dorfman H., Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips, II: Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* [53A], 523-537. 1971.
- (87) Ryu J., Treadwell B.V., Mankin H.J. Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* [27], 49-57. 1984.
- (88) Goldring M. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 2009;11(3):224.
- (89) Mort J.S., Billington C.J. Articular cartilage and changes in arthritis: Matrix degradation. *Arthritis Res* 3, 337-341. 2001.
- (90) Hedbom E., Hauselmann H.J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: The role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* [59], 45-53. 2002.
- (91) Morales T.I., Kuettner K.E. The properties of the neutral proteinase released by primary chondrocyte cultures and its action on proteoglycan aggregate. *Biochim Biophys Acta* [705], 92-101. 1982.
- (92) Sapolsky A.I., Howell D.S. Further characterization of a neutral metalloprotease isolated from human articular cartilage. *Arthritis Rheum* [25], 981-988. 1982.
- (93) Stanton H, Rogerson FM, East CJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* [434], 648-652. 2005.
- (94) Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001;17:25-51.

- (95) Tortorella MD, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* [284], 1664-1666. 1999.
- (96) Abbaszade I, et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J.Biol.Chem* [274], 23443-23450. 1999.
- (97) Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J BiolChem* [277], 22201-22208. 2002.
- (98) Glasson SS, Askew R, Sheppard B. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* [434], 644-648. 2005.
- (99) Majumdar MK, Askew R, Schelling S. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS- 5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* [56], 3670-3674. 2007.
- (100) Ilic MZ, East CJ, Rogerson FM. Distinguishing aggrecan loss from aggrecan proteolysis in ADAMTS-4 and ADAMTS-5 single and double deficient mice. *J Biol Chem* [282], 37420-37428. 2007.
- (101) Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* [127], 5475-5485. 2000.
- (102) Hashimoto G, Shimoda M, Okada Y. ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the Cterminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan. *J Biol Chem* [279], 32483-32491. 2004.

- (103) Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S. Synthesis and evaluation of aryl thioxothiazolidinone inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Lett* [17], 1185-1188. 2007.
- (104) Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S. 5-Phenyl-3-*H*-spiro[indoline-3,2-[1,3,4]thiadiazol]-2-one inhibitors of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Lett* [17], 5630-5633. 2007.
- (105) Nagase H. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Research & Therapy* 2003;5(2):94-103.
- (106) Caterson B. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix biology* 2000;19(4):333-44.
- (107) Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAMTS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* [9], 539-552. 2001.
- (108) Bau B, Gebhard PM, Haag J. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* [46], 2648-2657. 2002.
- (109) Pratta MA, Scherle PA, Yang G. Induction of aggrecanase-1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* [48], 119-133. 2003.
- (110) Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF- β . *J Immunol* [168], 1405-1412. 2002.
- (111) Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG. Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* [268], 1259-1268. 2001.

- (112) Campbell I.K., Wojta J., Novak U. Cytokine modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes: Down-regulation by tumor necrosis factor alpha and up-regulation by transforming growth factor- β basic fibroblast growth factor. *Biochim Biophys Acta* [1226], 277-285. 1994.

- (113) Ollivierre F, Gubler U., Towle C.A. Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: A mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* [141], 904-911. 1986.

- (114) Kandel R.A, Dinarello C.A., Biswas C. The stimulation of collagenase production in rabbit articular chondrocytes by interleukin-1 is increased by collagens. *Biochem Int* [15], 1021-1031. 1987.

- (115) Dodge G.R., Poole A.R. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* [83], 647-661. 1989.

- (116) Murphy G., Docherty A.J.P. Molecular studies on the connective tissue metalloproteinases and their inhibitor TIMP. Galuert A.M., ed. *The Control of Tissue Damage*. Oxford: Elsevier; 1988. p. 223.

- (117) Malesmud C.J. The role of growth factors in cartilage metabolism. *Rheum Dis Clin N Am* [19], 569-580. 1993.

- (118) Morales T.I. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-1 restore proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage after depletion by retinoic acid. *Arch Biochem Biophys* [315], 190-198. 1994.

- (119) Kevorkian L, Young D.A, Darrah C. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* [50], 131-141. 2004.

- (120) Slemenda C., Heilman D.K., Brandt K.D. Reduced quadriceps strength relative to body weight: A risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* [41], 1951-1959. 1998.

- (121) Kovar P.A., Allegrante J.P., MacKenzie R. Supervised fitness walking in patients with osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med* [116], 529-534. 1992.

- (122) Thomas K.S., Muir K.R., Doherty M. Home based exercise programme for knee pain and knee osteoarthritis: Randomised controlled trial. *BMJ* [325], 752. 2002.

- (123) Brand R.A., Crowninshield R.D. The effect of cane use on hip contact force. *Clin Orthop* 147, 181-184. 1980.

- (124) Chan G.N., Smith A.W., Kirtley C, Tsang W.W. Changes in knee moments with contralateral versus ipsilateral cane usage in females with knee osteoarthritis. *Clin Biomech* 20, 396-404. 2005.

- (125) Keating E.M. Use of lateral heel and sole wedges in the treatment of medial osteoarthritis of the knee. *Orthop Rev* 22, 921-924. 1993.

- (126) Pollo FE. Reduction of medial compartment loads with valgus bracing of the osteoarthritic knee. *Am J Sports Med* 30, 414-421. 2002.

- (127) Cushnaghan J.. Taping the patella medially: A new treatment for osteoarthritis of the knee joint? *BMJ* 308, 753-755. 1994.

- (128) Feeley BT. Management of osteoarthritis of the knee in the active patient. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2010;18(7):406-16.

- (129) Towheed TE. A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the knee, with an emphasis on trial methodology. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1997;26(5):755-70.
- (130) Rains C., Bryson H.M. Topical capsaicin: A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. *Drugs Aging* 7, 317-328. 1995.
- (131) McCarthy G.M., McCarty D.J. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol* [19], 604-607. 1992.
- (132) Deal C.L., Schnitzer T.J, Lipstein E, et al. Treatment of arthritis with topical capsaicin: A double-blind trial. *Clin Ther* [13], 383-395. 1991.
- (133) Niethard F.U., Gold M.S., Solomon G.S. Efficacy of topical diclofenac diethylamine gel in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* [32], 2384-2392. 2005.
- (134) Sandelin J., Harilainen A, Crone H. Local NSAID gel (eltenac) in the treatment of osteoarthritis of the knee: A double blind study comparing eltenac with oral diclofenac and placebo gel. *Scand J Rheumatol* [26], 287-292. 1997.
- (135) Bradley J.D, Brandt K.D., Katz B.P. Comparison of an antiinflammatory dose of ibuprofen, an analgesic dose of ibuprofen, and acetaminophen in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* [325], 87-91. 1991.
- (136) Pincus T., Koch G.G., Sokka T. A randomized, double-blind crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *Arthritis Rheum* [44], 1587-1598. 2001.

- (137) Solomon S.D., McMurray J.V, Pfeffer M.A. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* [352], 1071-1080. 2005.

- (138) Young L., Katrib A., Cuello C. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: Findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* [44], 343-350. 2001.

- (139) Petrella R.J. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Intern Med* 162, 292-298. 2002.

- (140) Kuiper-Geertsma D.G. BJW. Intra-articular injection of hyaluronic acid as an alternative option to corticosteroid injections for arthrosis. *Ned Tijdschr Geneesk* 144, 2188-2192. 2000.

- (141) Pelletier J.P., Mineau F., Ranger P. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: Possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* [4], 77-84. 1996.

- (142) Caron J.P., Fernandes J.C., Martel-Pelletier J. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* [39], 1535-1534. 1996.

- (143) Pelletier J.P., Caron J.P., Evans C. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum* [40], 1012-1019. 1997.

- (144) Fernandes J., Tardif G, Martel-Pelletier J. In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: Prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol* [154], 1159-1169. 1999.
- (145) Pelletier JP. DMOAD developments: present and future. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;65(3):242-8.
- (146) Storm E.E, Kingsley D.M. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* [122], 3969-3979. 1996.
- (147) Hatakeyama Y, Tuan RS, Shum L. Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis. *J.Cell Biochem.* [91], 1204-1217. 2004.
- (148) Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, et al. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* [126], 1305-1315. 1999.
- (149) Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering. *Ann.Biomed.Eng.* [32], 466-476. 2004.
- (150) Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin.Arthritis Rheum* [31], 33-42. 2001.
- (151) Luyten FP. Cartilage-derived morphogenetic protein-1. *Int.J.Biochem.Cell Biol* [29], 1241-1244. 1997.
- (152) Merino R., Macias D., Ganan Y., Economides A.N., Wang X., Wu Q., et al. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev.Biol.* [206], 33-45. 1999.

- (153) Tsumaki N., Tanaka K., Arikawa-Hirasawa E., Nakase T., Kimura T., Thomas J.T., et al. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J.Cell Biol.* [144], 161-173. 1999.

- (154) Southam L, Rodriguez-Lopez J, M.Wilkins J. An SNP in the 50-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Human Molecular Genetics* 16[18], 2226-2232. 2007.

- (155) Faiyaz-Ul-Haque M, Ahmad W., Zaidi S.H.E., Haque S., Teebi A.S., Ahmad M., et al. Mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene in a kindred affected with fibular hypoplasia and complex brachydactyly (DuPan syndrome). *Clin.Genet.* [61], 454-458. 2002.

- (156) Savarirayan R., White S.M., Goodman F.R, Graham J.M.Jr, Delatycki M.B., Lachman R.S., et al. Broad phenotypic spectrum caused by an identical heterozygous CDMP-1 mutation in three unrelated families. *Am.J.Med.Genet.* [117], 136-142. 2003.

- (157) Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5'-UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat.Genet* [39], 529-533. 2007.

- (158) Buxton P. Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *Journal of Bone and Joint Surgery; American volume* 2001;83-A Suppl 1(1):S23-S30.

- (159) Francis-West PH. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 1999;126(6):1305-15.

- (160) Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* [271], 21345-21352. 1996.

- (161) Baur ST, Mai JJ, Dymecki SM. Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development* [127], 605-619. 2000.
- (162) Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. *CellStruct Funct* [25], 195-204. 2000.
- (163) Aoki H, Fujii M, Imamura T. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci* [114], 1483-1489. 2001.
- (164) Chen D. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22(4):233-41.
- (165) Wolfman NM, Hattersley G, Cox K. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* [100], 321-330. 1997.
- (166) Simank HG, Manggold J, Sebald W. Bone morphogenetic protein-2 and growth and differentiation factor-5 enhance the healing of necrotic bone in a sheep model. *Growth Factors* [19], 247-257. 2001.
- (167) Kuniyasu H, Hirose Y, Ochi M. Bone augmentation using rhGDF-5-collagen composite. *Clin Oral Implants Res* [14], 490-499. 20093.
- (168) Rickert M. A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. *Growth Factors* 2001;19(2):115-26.
- (169) Storm EE. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Developmental biology* 1999;209(1):11-27.

- (170) Mikic B. Altered hypertrophic chondrocyte kinetics in GDF-5 deficient murine tibial growth plates. *Journal of Orthopaedic Research* 2004;22(3):552-6.
- (171) Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 32[4], 387-388. 1973.
- (172) McDevitt C, Muir H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthrosis in the dog. *J Bone Joint Surg* 58B, 94-101. 1976.
- (173) McDevitt C, Muir H, Eyre D. Macromolecular biochemistry of cartilage in the initial stages of experimental canine osteoarthritis. Nuki G, ed. *The aetiopathogenesis of osteoarthritis.* London: Pitman; 1980.
- (174) Pelletier JP. Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 1983;26(7):866-74.
- (175) Pelletier JP. Role of synovial membrane inflammation in cartilage matrix breakdown in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 1985;28(5):554-61.
- (176) Powers MY. Prevalence of cranial cruciate ligament rupture in a population of dogs with lameness previously attributed to hip dysplasia: 369 cases (1994-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005;227(7):1109-11.
- (177) Benderdour M. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *The Journal of rheumatology* 2002;29(6):1262-72.
- (178) Menkes CJ. Radiographic criteria for classification of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology Supplement* 1991;27:13-5.

- (179) Cheng X. Effect of growth and differentiation factor 5 gene transferred by adenovirus on hBMSCs osteogenic differentiation. *zhong guo xiu fu chong jian wai ke za zhi* 2009;23(8):985-90.
- (180) Cui L. Cartilage-derived morphogenetic protein 1 initiates chondrogenic differentiation of human dermal fibroblasts in vitro. *zhong hua yi xue za zhi* 2004;84(15):1304-9.
- (181) Erlacher L. Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *Journal of bone and mineral research* 1998;13(3):383-92.
- (182) Feiock D.A. NJSNAHea. Radiological evaluation of total knee arthroplasty. In: Bono J. SRD, editor. *Revision total knee arthroplasty*. SpringerNew York; 2005. p. 36-52.
- (183) Erlacher L. Presence of cartilage-derived morphogenetic proteins in articular cartilage and enhancement of matrix replacement in vitro. *Arthritis and rheumatism* 1998;41(2):263-73.
- (184) Martel-Pelletier J. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis and rheumatism* 1992;35(5):530-40.
- (185) Isnard N, Legeais JM, et al. Effect of hyaluronan on MMP expression and activation. *Cell.Biol.Int.* [25], 735-739. 2001.
- (186) Ohno S, Ohno-Nakahara M, et al. Induction of MMP-3 by hyaluronan oligosaccharides in temporomandibular joint chondrocytes. *J.Dent.Res.* [84], 1005-1009. 2005.
- (187) Takei I. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *Journal of biomedical materials research* 1999;45(3):175-83.

- (188) Qureshi HY, Ahmad R, Sylvester J, Zafarullah M. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF- β in human chondrocytes. Cellular Signalling [19], 1643-1651. 2007.

- (189) Wayne GJ. TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is modulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4. The Journal of Biological Chemistry 2007;282(29):20991-8.

- (190) Tashiro T. Effect of GDF-5 on ligament healing. Journal of Orthopaedic Research 2006;24(1):71-9.